

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ-UFPR
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPA1 NA HIPERALGESIA
INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE
PROSTAGLANDINA E₂ NA PATA DE RATOS.**

MARCELO CAVALHEIRO DALL'ACQUA

CURITIBA – PR

2011

MARCELO CAVALHEIRO DALL' ACQUA

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPA1 NA HIPERALGESIA
INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DE
PROSTAGLANDINA E₂ NA PATA DE RATOS.**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Paraná, pelo Programa de
Pós-Graduação em Biologia Molecular e
Celular, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre

Área de Concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Luana Fischer

Curitiba, julho de 2011.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução e divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte e comunicado ao autor a referência da citação.

Curitiba, 30 de julho de 2011.

Assinatura:

E-mail: marcelodallacqua@hotmail.com

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná.

N do Protocolo: 366

Data: 07/04/2009

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

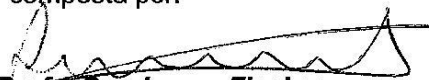
Setor de Ciências Biológicas

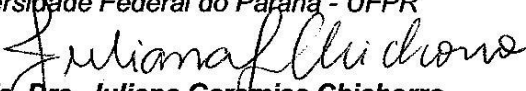
Universidade Federal do Paraná


Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dra. Luana Fischer
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dra. Juliana Geremias Chichorro
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dra. Joice Maria da Cunha
Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplentes,

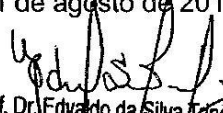
Prof. Dra. Anete Curte Ferraz
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após argüir o mestrando **Marcelo Cavalheiro Dall' Acqua**, em relação ao seu trabalho intitulado: **"Participação do receptor TRPA1 na hiperalgesia inflamatória induzida pela administração de prostaglandina E2 na pata de ratos: estudo dos mecanismos envolvidos"** são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do acadêmico, habilitando-o ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de agosto de 2011


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

À minha mãe e memória de meu pai

Pelo imenso amor, esforço, dedicação, carinho, incentivo e exemplos, que sempre demonstraram em cada etapa de minha vida. Suas presenças firmes e constantes, sempre me proporcionaram uma trajetória tranqüila, baseada na verdade e unidade familiar, permitindo-me alcançar todos os meus objetivos. Nenhuma palavra pode expressar a tamanha dívida e gratidão que sinto por vocês.

Obrigado, obrigado, obrigado.

Amo vocês!

À minha esposa Jarzis e meu querido e amado filho João Pedro

A você minha esposa, meu eterno reconhecimento por seu amor incondicional, companheirismo, voluntarismo, carinho e dedicação. Foram tantos momentos de felicidade com etapas vencidas ao seu lado, quanto foram os momentos difíceis e em todos eles sua presença foi fundamental. Te amo.

A você meu filho, que justifica todo e qualquer sacrifício que fazemos para sermos honrados. Você é um presente enviado por Deus que a cada dia renova minha vontade de viver. Poder acompanhar seu crescimento e desenvolvimento tem sido a minha maior aventura. Você é o que realmente importa nesta vida complicada. Obrigado por ter vindo ao mundo me. Papai te ama desde o primeiro instante...

“Dedico este sonho realizado com todo carinho e gratidão”.

AGRADECIMENTO

À Deus

Pela dádiva da vida, Ser infinitamente bom, que permitiu que vivesse este momento maravilhoso de conclusão de um ideal. Que se fez presente nos momentos mais difíceis durante esta trajetória, provando-me sua existência em pequenos e grandes acontecimentos. Proporcionando-me alegrias e superação de inúmeras dificuldades, preparando-me para mais uma etapa, que certamente somente Ele sabe qual será.

Em especial à minha orientadora Professora Dra. Luana Fischer por abrir as portas do mundo das ciências, orientando-me e transmitindo seus ensinamentos. Agradeço pela confiança, paciência, respeito e amizade.

Ao Professor Dr. Carlos Damiani, agradeço pela amizade, incentivo e apoio desde o início desta caminhada ainda na graduação.

Ao Professor Dr. Fernando Louzada, agradeço pela sensibilidade de ter me indicado à Professora Luana Fischer, o que nos trouxe a este momento.

À Universidade Federal do Paraná, aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular pela oportunidade de conviver e adquirir novos e importantes conhecimentos e por contribuírem para minha formação.

“Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde.

E por pensarem ansiosamente no futuro esquecem-se do presente de forma que acabam por não viver nem no presente, nem no futuro. E vivem como se nunca fossem morrer e morrem como se nunca tivessem vivido.”

Dalai Lama

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura Molecular do Receptor TRPA1 e TRPV1.....	32
Figura 2: Irritantes químicos que ativam o receptor TRPA1.....	35
Figura 3: Sensibilização e ativação do TRPA1 e TRPV1	37
Figura 4: Aparelho de Von Frey eletrônico e caixas acrílicas.....	45
Figura 5A: Papel essencial do receptor TRPA1 na hiperalgesia induzida pela PGE ₂	54
Figura 5B e 5C: Análise por Western Blot da expressão de TRPA1 no gânglio da raiz dorsal L4 e 5 de animais tratados com antisense (i.t.) para TRPA1 ou veículo	55
Figura 6: O receptor TRPA1 não contribui para o limiar nociceptivo basal.....	56
Figura 7: O TRPA1 medeia a sensibilização induzida pela prostaglandina E ₂ é evidenciada por estímulo químico.....	57
Figura 8: Análise por Western Blot da expressão de TRPA1 no gânglio da raiz dorsal L5e L6 de animais tratados com prostaglandina E ₂ ou veículo.....	58
Figura 9: Comparação do efeito hiperlagésico induzido pela PGE ₂ e seus mediadores.....	60
Figura 10: Papel do receptor TRPA1 na hiperalgesia induzida pelo AMPc.....	61
Figura 11: Papel do receptor TRPA1 na hiperalgesia induzida pelo pKAcs.....	62
Figura 12: Papel do receptor TRPA1 na hiperalgesia induzida pelo pKCε.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato ciclase
AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
ASICs	Canais iônicos sensíveis ao ácido
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BK	Bradicinina
CG	Carragenina
CFA	Composto Adjuvante de Froyd
Ca⁺⁺	Íon cálcio
COX	Enzima Cicloxigenase
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DAG	Diacilglicerol
db-cAMP	N6,2'-O-dibutyryladenosine 3':5'-cyclic monophosphate
DMSO	Dimetilsulfóxido
GMPc	Guanosina monofosfato-cíclico
g	Grama
HC-O30031(HC)	Antagonista do receptor TRPA1
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
IP₃	Inositol trifosfato
i.t.	Intratecal
IL-1β	Interleucina 1β

LOX	Lipoxigenase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
NaCl	Solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (salina)
ng	Nanograma
NO	Óxido nítrico
NGF	Fator de crescimento neural
ODN-antisense	Antisense para o receptor TRPA1
p38 MAPK	Proteína quinase p38 pertencente a família da proteína quinase ativada por mitógeno
PGA₂	Metabólito de prostaglandina formados a partir da PGE ₂ .
PGA₁	Metabólito de prostaglandina formados a partir da PGE ₁ .
PGJ₂	Metabólito de prostaglandina formados a partir da PGD ₂ .
PGD₂	Prostaglandina D ₂ .
PGE₂	Prostaglandina E ₂ .
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGG	Prostaglandina G ₂ .
PGI₂	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
pKA	Proteína quinase A
pKAcs	Subunidade catalítica da proteína quinase A
pKC	Proteína quinase C
pKCε	Proteína quinase C épsilon
PIP₂	Fosfatidil inositol bifosfato
PLA₂	Fosfolipase A2
PPARs	Receptores ativadores de proliferação do peroxissomo

PAR-2	Receptores ativados por proteases 2
ψεRACK	Pseudo receptor para pKCε ativada
PLC	Fosfolipase C
PPPi	Íons intracelulares polifosfatos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SP	Substância P
SNC	Sistema nervoso central
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPs	Receptores de potencial transitório
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina -1
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide -1
TTX-R I_{NA}	Canais de sódio resistentes a tetrodotoxina
U	Unidades
μg	Microgramas

RESUMO

O receptor ionotrópico TRPA1 pertence à superfamília de receptores TRP (Receptor de Potencial Transitório), é expresso preferencialmente em neurônios nociceptivos primários e tem ganhado destaque devido a seu importante papel na condução da informação nociceptiva em condições inflamatórias. A lesão tecidual associada a inflamação determina a síntese e a liberação de mediadores inflamatórios que induzem a sensibilização dos neurônios nociceptivos primários, levando a hiperalgesia, caracterizada pelo aumento da resposta a um determinado estímulo. Esse fenômeno é comum a todas as dores de origem inflamatória e os mecanismos envolvidos na participação do receptor TRPA1 nesse processo de sensibilização ainda são pouco conhecidos. Entre os mediadores inflamatórios liberados no sítio da lesão as prostaglandinas, especialmente as da série E_2 , têm papel chave no processo de sensibilização inflamatória. A hiperalgesia induzida pela prostaglandina E_2 (PGE_2) é mediada pela ativação de seus receptores acoplados a proteína G e depende da formação de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) e subsequente ativação das proteínas quinases A (pKA) e C épsilon ($pKC\epsilon$). Como o TRPA1 pode ser ativado em resposta a ativação de receptores de mediadores inflamatórios e já foi demonstrado que, pelo menos a pKA, é capaz de ativar o TRPA1 *in vivo*, é possível que o TRPA1 desempenhe papel relevante na hiperalgesia inflamatória induzida por prostaglandinas. Portanto, o primeiro objetivo desse trabalho foi investigar a participação do TRPA1 no processo de sensibilização do nociceptor primário induzido pela PGE_2 . O segundo objetivo foi identificar o mecanismo responsável pela ativação do TRPA1 durante o processo de sensibilização induzido pela PGE_2 . O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1 por seu antagonista específico HC 030031 (1200 μ g) diminuiu significativamente e o tratamento intratecal com ODN-antisense contra TRPA1 (5 nmol por dia, durante 4 dias) bloqueou a hiperalgesia mecânica induzida pela administração de PGE_2 (100 ng) na pata de ratos. O tratamento intratecal com ODN-antisense bloqueou a expressão do receptor TRPA1 em células do gânglio da raiz dorsal (L5 e 6) relativas ao campo receptivo periférico onde a PGE_2 foi administrada. O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1, pela administração de seu antagonista seletivo ou a diminuição de sua expressão neuronal através da administração de ODN-antisense não afetou o limiar nociceptivo mecânico, avaliado após administração de NaCl 0,9%. Como alguns trabalhos sugerem que o TRPA1 pode ser ativado por estímulos mecânicos e, no presente estudo, utilizamos um teste comportamental no qual um estímulo mecânico é utilizado para avaliar a hiperalgesia inflamatória, foi necessário excluir a possibilidade de que o TRPA1 mediasse apenas a sensibilização inflamatória evidenciada por estimulação mecânica. Para isso, utilizamos também um estímulo químico: uma baixa dose de capsaicina. A nocicepção induzida pela administração de capsaicina (0,5 μ g) na pata foi significativamente aumentada pela administração prévia (3 horas antes) de PGE_2 . O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1, através da administração de seu antagonista, reverteu completamente a sensibilização induzida pela PGE_2 , enquanto não afetou a nocicepção induzida pela capsaicina por si só. Esses dados nos permitem concluir que independentemente da participação do TRPA1 na transdução do estímulo mecânico, este receptor definitivamente está envolvido na sensibilização inflamatória dos neurônios nociceptivos primários. A administração intraplantar de PGE_2 não aumentou significativamente a expressão do TRPA1 em células do gânglio da raiz dorsal (L5 e 6). Para identificar o mecanismo envolvido na participação do receptor TRPA1 no

processo de sensibilização induzido pela PGE_2 utilizamos os mediadores que atuam nos diferentes estágios da cascata de eventos intracelulares induzida pela PGE_2 e verificamos o efeito do bloqueio do TRPA1 na resposta hiperalgésica de cada um deles. O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1 por seu antagonista seletivo diminuiu significativamente a hiperalgesia induzida pela administração de AMPc, pKA ou pKC ϵ . O tratamento intratecal com ODN-antisense contra TRPA1 diminuiu significativamente a hiperalgesia induzida pela administração de pKA ou pKC ϵ . Como o aumento do AMPc precede a ativação da pKA, que posteriormente se traduz na ativação da pKC ϵ , não se sabe se cada um desses mediadores ativa o TRPA1 paralelamente ou se a ativação do TRPA1 é mediada exclusivamente pela isoforma épsilon da pKC. Em conjunto, esses dados demonstram que o receptor TRPA1 é essencial para a hiperalgesia induzida pela PGE_2 e sugerem que o bloqueio desse receptor pode ser uma boa estratégia terapêutica para tratamento e controle da dor inflamatória.

Palavras-chave: TRPA1, PGE_2 , AMPc, pKA, pKC, pKC ϵ , prostaglandina, hiperalgesia.

ABSTRACT

The ionotropic receptor TRPA1 belongs to the superfamily of TRP channels, is expressed mainly in nociceptive C fibers and has received increased attention due to its central role in inflammatory nociceptive mechanisms. Tissue injury during inflammation leads to the synthesis and release of inflammatory mediators that sensitizes primary nociceptive neurons. This condition is called hyperalgesia and is characterized by an increased response to low intensity stimuli. Among inflammatory mediators, prostaglandins, especially those of the E₂ series, have a central role in nociceptor sensitization. Prostaglandin E₂ (PGE₂)-induced hyperalgesia is mediated by activation of its selective G protein coupled receptors and depends of cAMP (cyclic adenosine monophosphate) formation and subsequent activation of protein kinase A (pKA) and C epsilon (pKCε). In this study we asked if TRPA1 mediates PGE₂-induced hyperalgesia, and if so, what the mechanisms involved. The pharmacological blocked of TRPA1 by its specific antagonist (HC 030031, 1200 μg) significantly decreased PGE₂ (100 ng)-induced mechanical hyperalgesia in the rat's paw. The treatment with ODN-antisense (intrathecal administration of 5 nmol per day during four days) significantly decreased TRPA1 expression in dorsal root ganglia cells (L5-6) and blocked PGE₂-induced hyperalgesia. The treatment with ODN-antisense or with the TRPA1 antagonist did not affect basal mechanical nociceptive threshold. Since some studies suggested that TRPA1 may be gated by mechanical stimuli, we used a chemical (a small dose of capsaicin) in addition to the mechanical stimulus to verify the participation of TRPA1 in PGE₂-induced sensitization. The nociception induced by capsaicin (0,5 μg) was significantly increased by the previous administration of PGE₂ (100 ng, three hours before). This PGE₂-induced sensitization was blocked by the co- administration of the TRPA1 receptor antagonist, which have no effect by itself on capsaicin-induced nociception. This finding demonstrated that independently of the role of TRPA1 in mechanical stimuli transduction, this receptor mediates PGE₂-induced inflammatory sensitization. The administration of PGE₂ in the rat's paw did not increase significantly TRPA1 expression in dorsal root ganglia cells (L5-6). To identify the mechanism underlying TRPA1 activation during PGE₂-induced hyperalgesia, we have used the intracellular mediators involved in PGE₂ signaling. The pharmacological blocked of TRPA1 by its selective antagonist significantly decreased cAMP, pKA or pKCε-induced mechanical hyperalgesia in the rat's paw. The treatment with ODN-antisense significantly decreased pKA or pKCε-induced mechanical hyperalgesia in the rat's paw. Since the increase in cAMP leads to pKA activation, which activates pKCε, it was not possible to determine if each one of this mediators contribute to TRPA1 activation or if it is induced only by pKCε. The findings of this study demonstrated that TRPA1 receptor is essential to PGE₂-induced hyperalgesia and suggest that future therapeutic strategies based on TRPA1 blockade may be useful in the treatment of inflammatory pain.

Keywords: TRPA1, PGE₂, AMPc, PKA, PKC, pKCε, prostaglandin, hyperalgesia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Dor.....	21
2.2 Mecanismos periféricos da dor.....	22
2.3 Prostaglandinas	24
2.4 Canais TRP (Receptores de Potencial Transitório)	27
2.4.1 Receptor de potencial transitório vanilóide 1 – (TRPV1)	28
2.4.2 Receptor de potencial transitório anquirina 1 – (TRPA1)	30
2.5 Mecanismos de sinalização celular envolvidos na sensibilização do nociceptor primário	38
3 PROPOSIÇÃO	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Animais	44
4.2 Drogas e anticorpos	44
4.3 Teste comportamental de hiperalgesia mecânica	45
4.4 Nocicepção.....	46
4.5 Administração intratecal de ODN-antisense.....	46
4.6 Western Blot	47
4.7 Delineamento experimental	49
4.8 Análise estatística dos resultados	52
5 RESULTADOS	53
6 DISCUSSÃO	64
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXO (Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPr.)	94

1 INTRODUÇÃO

A dor é considerada um dos maiores problemas de saúde pública da sociedade atual e embora nosso conhecimento sobre os mecanismos nociceptivos tenha evoluído muito nos últimos anos, os fármacos utilizados para o controle da dor hoje pertencem a mesma classe de fármacos utilizados há décadas. São basicamente antiinflamatórios e analgésicos opióides cujo uso clínico é marcado por um alto índice de insucessos e/ou de efeitos colaterais que se intensificam com o uso crônico. A maioria das condições dolorosas é de origem inflamatória periférica e vários estudos experimentais têm sido conduzidos com o objetivo de identificar novos alvos moleculares para o tratamento da dor inflamatória em sua origem, ou seja, na periferia. Nesse contexto, o receptor ionotrópico de potencial transitório com domínios anquirina -1 (TRPA1) parece um excelente alvo em potencial, pois além de ser expresso preferencialmente em neurônios nociceptivos primários, parece ser ativado por uma ampla variedade de mecanismos associados a inflamação.

A lesão tecidual e a inflamação estão associadas a síntese e liberação de mediadores inflamatórios que ativam diretamente os nociceptores primários, induzindo dor espontânea ou que os sensibilizam induzindo quadros de hiperalgesia e alodinia. Essa sensibilização é um fenômeno comum a todas as dores de origem inflamatória e caracteriza-se pela diminuição do limiar nociceptivo que pode ser experimentalmente avaliada pelo aumento da resposta a um estímulo que pode ou não ser nociceptivo (COUTAUX et al., 2005). Os mecanismos moleculares responsáveis pela sensibilização do nociceptor primário são complexos, mas tem sido sugerido que a ativação de mecanismos intracelulares como aqueles dependentes da ativação da proteína quinase A (pKA) induzem aumento de Cálcio (Ca^{++}) intracelular, fechamento de canais de potássio e fosforilação de canais de

sódio (DRAY., 1995), fazendo com que o nociceptor fique levemente despolarizado e passe a responder facilmente a estímulos que antes eram incapazes de ativá-lo. Entre os mais importantes mediadores inflamatórios responsáveis pela sensibilização dos neurônios nociceptivos primários estão as prostaglandinas (PGs), especialmente as da série E_2 (PGE_2), conhecidas por seu papel chave na indução e manutenção de mecanismos responsáveis pela sensibilização dos nociceptores primários (SAMAD, SAPIRSTEIN, WOOLF, 2002). Os receptores de PGE_2 pertencem a família de receptores acoplados a proteína G que ao ativar a adenilato ciclase (AC), levam ao aumento nos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e a ativação da pKA. De fato, vários estudos demonstram que a PGE_2 induz sensibilização que atinge seu pico três horas após a administração, podendo perdurar por até 24 horas (FERREIRA, NAKAMURA, 1979), e que é totalmente bloqueada por inibidores da pKA (TAIWO, LEVINE, 1991; PARADA, REICHLING, LEVINE, 2005; SACHS et al., 2009). Além da pKA, um estudo recente demonstrou o envolvimento da isoforma épsilon da proteína quinase C ($pKC\epsilon$) na sensibilização induzida pela PGE_2 (SACHS et al. 2009). Os achados desse estudo demonstram que tanto os inibidores da AC e da pKA quanto da $pKC\epsilon$ inibem a hiperalgesia induzida por PGE_2 na pata de ratos. No entanto, quando esses inibidores são administrados 90 minutos depois da PGE_2 , só o inibidor da $pKC\epsilon$ é eficaz em bloquear a hiperalgesia. De fato, 90 minutos após a injeção de PGE_2 os níveis de atividade da $pKC\epsilon$ são máximos enquanto os da pKA se encontram elevados apenas no início do processo, por volta de 30 minutos após a injeção de PGE_2 (SACHS et al. 2009). A ativação da $pKC\epsilon$ parece depender da atividade da pKA, uma vez que o inibidor da $pKC\epsilon$ bloqueia a hiperalgesia induzida pela subunidade catalítica da pKA ($pKAcs$), mas o contrário não ocorre. Juntos, esses dados sugerem que a pKA é

essencial na fase inicial da indução da hiperalgesia induzida por PGE_2 , mas que a manutenção desse estado é dependente da ativação mais tardia da $\text{pKC}\epsilon$ (SACHS et al. 2009).

O receptor TRPA1 pertence a superfamília de receptores TRP (Receptor de Potencial Transitório – do inglês *Transient Receptor Potential*) e como tal é um canal de cátions não seletivo que, como mencionado anteriormente, parece ser expresso preferencialmente em neurônios nociceptivos primários (BANDELL et al. 2004; BAUTISTA et al. 2006). Apesar de ter sido inicialmente associado à detecção de temperaturas frias nocivas (STORY et al. 2003), recentemente o TRPA1 tem ganho destaque como um receptor importante para a condução da informação nociceptiva em condições inflamatórias (BANDELL et al. 2004; DAI et al. 2007; MACPHERSON et al. 2007b; McNAMARA et al. 2007; PETRUS et al. 2007; ANDRADE et al. 2008; WANG et al. 2008). O receptor TRPA1 pode ser ativado diretamente, por substâncias eletrofílicas que se ligam covalentemente a resíduos de cisteína do canal (HINMAN et al. 2006; MACPHERSON et al. 2007a). As primeiras substâncias químicas identificadas como capazes de ativá-lo foram os compostos irritantes presentes em extratos de alho, a alicina (MACPHERSON et al. 2005), e de mostarda, o alil isotiocianato (JORDT et al. 2004). Recentemente foi demonstrado que substâncias endógenas também ativam diretamente o TRPA1, é o caso de metabólitos eletrofílicos das prostaglandinas E_2 e D_2 (CRUZ-ORENGO et al. 2008; TAYLOR-CLARK et al. 2008) e do 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (MACPHERSON et al. 2007b; TREVISANI et al. 2007), um aldeído endógeno produzido em altas concentrações através da peroxidação dos fosfolipídios de membrana em resposta a lesão tecidual e inflamação.

Além da ativação direta por substâncias endógenas e exógenas, tem sido demonstrado que o TRPA1 funciona como um canal ativado indiretamente por mediadores, ou seja, esses mediadores uma vez liberados no sítio da lesão, ativam seus respectivos receptores que iniciam vias de sinalização celular que levam a ativação do TRPA1. Por exemplo, foi demonstrado que a hiperalgesia induzida pela administração de BK na pata depende do receptor TRPA1 que é ativado em resposta a ativação da pKA e da via da fosfolipase C (PLC) pelo receptor B₂ de BK (BANDELL et al. 2004; BAUTISTA et al. 2006; WANG et al. 2008). Os mecanismos pelos quais a PLC ativa o TRPA1 não são totalmente conhecidos, mas parecem ser mediados pelo aumento do cálcio intracelular (ZURBORG et al. 2007) e pelo diacilglicerol (DAG) (BANDELL et al. 2004), que é responsável pela ativação da proteína quinase C (pKC). A PLC e a pKA podem ser ativadas por inúmeros mediadores inflamatórios e estão entre os principais mecanismos responsáveis pela sensibilização do nociceptor primário. Logo, se o TRPA1 pode ser ativado por ambas as vias, possivelmente esse receptor desempenha papel importante no processo de sensibilização periférica, contribuindo para a instalação e manutenção da hiperalgesia e alodinia inflamatórias. De fato, alguns estudos já demonstraram que além de mediar a hiperalgesia induzida pela BK (BANDELL et al. 2004; BAUTISTA et al. 2006; WANG et al. 2008), o receptor TRPA1 medeia a hiperalgesia inflamatória induzida pela administração de composto adjuvante de Freund (CFA) na pata (OBATA et al. 2005; PETRUS et al. 2007).

No entanto, o papel do receptor TRPA1 no processo de sensibilização do nociceptor primário e os mecanismos envolvidos ainda são pouco conhecidos. Por exemplo, apesar de já ter sido demonstrado que metabólitos eletrofílicos das PGs ativam diretamente o TRPA1, não sabemos qual a contribuição desse receptor na

sensibilização induzida por esses importantes mediadores inflamatórios. Isso por que uma porção muito pequena das PGs é transformada nesses metabólitos eletrofílicos *in vivo* e esses metabólitos parecem não contribuir de forma significativa para a hiperalgesia inflamatória. Ao contrário, conforme discutido acima, a hiperalgesia induzida por PGs *in vivo* é mediada principalmente pelas PGs da série E_2 e depende da ativação de seus receptores acoplados a proteína G e da ativação das pKA e pKC ϵ . Tendo em vista o TRPA1 funciona como um canal ativado indiretamente por mediadores inflamatórios e que já foi demonstrado que pelo menos a pKA é capaz de ativar o TRPA1 *in vivo* é provável que o TRPA1 desempenhe papel relevante na hiperalgesia inflamatória induzida por PGs. Portanto, o primeiro objetivo desse trabalho foi investigar a participação do TRPA1 no processo de sensibilização do nociceptor primário induzido por PGE $_2$. O segundo objetivo identificar o mecanismo responsável pela ativação do TRPA1 durante o processo de sensibilização induzido pela PGE $_2$.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dor

A sensação de dor é um mecanismo de alerta do organismo que indica a presença de um estímulo lesivo e que aciona respostas protetoras apropriadas (WOOLF, SALTER, 2000); (JULIUS, BASBAUM, 2001). Dessa maneira, o funcionamento adequado do sistema nociceptivo é essencial para proteger o organismo de danos teciduais. Entretanto, sob condições patológicas, este sistema se torna sensibilizado e a dor transforma-se em uma doença (ZEILHOFER, 2005).

De acordo com a terminologia proposta pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (em inglês, IASP), a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada à lesão tecidual real ou potencial (IASP, 2007). Portanto, sua percepção é complexa e não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos no cérebro (JULIUS, BASBAUM, 2001).

Desta forma, a percepção da dor depende de fatores fisiológicos (sensoriais) e psicológicos. O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, ou seja, a consequência da estimulação das fibras aferentes primárias. Assim, a nocicepção pode ser considerada como o processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos ou químicos nocivos são detectados por uma sub-população de fibras nervosas periféricas, chamadas nociceptores (BASBAUM et al., 2009). Portanto, enquanto a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo, a nocicepção refere-se aos mecanismos neurofisiológicos gerados pelo estímulo nocivo. Em animais a dor pode ser avaliada indiretamente, através da observação comportamental evidenciada pela estimulação nociceptiva. Desta maneira, modelos animais de dor são de fato

modelos de nocicepção (TJOLSEN, HOLE., 1997), uma vez que a discriminação do componente emocional da dor é limitada. Esses estudos experimentais têm contribuído para o entendimento dos múltiplos mecanismos envolvidos na transmissão e processamento da informação nociceptiva. Algo essencial para a identificação de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de drogas que alcancem um maior índice de sucesso no tratamento e controle da dor aliado a menores efeitos colaterais. Esse recente avanço no conhecimento sobre os mecanismos nociceptivos contrasta com a ausência de avanços nas estratégias terapêuticas, pois os fármacos utilizados hoje para o controle da dor são os mesmos há décadas, basicamente opióides e antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), que, embora eficazes em grande parte das condições dolorosas, apresentam efeitos adversos que tornam o tratamento clínico limitado (NEGUS et al., 2006; WOODCOCK, WITTER, DIONNE, 2007). Dentre os efeitos adversos apresentados pelos analgésicos opióides, um importante fator limitante é o aparecimento da tolerância analgésica e a possibilidade de desenvolvimento de dependência química. Entre os AINEs, o problema mais freqüente está relacionado às complicações gastrointestinais (HENRY, LIM, GARCIA-RODRIGUES, 1996; COLLETT, 1998; MERCADANTE, 1999; WHITTLE, 2003).

2.2 Mecanismos periféricos da dor

O primeiro passo na seqüência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transformação dos estímulos nocivos em potenciais de ação que são transmitidos para o sistema nervoso central (SNC) pelas fibras nervosas periféricas (BESSON, PERL, 1969). A recepção do estímulo nociceptivo na periferia se dá por estruturas específicas, localizadas nas terminações nervosas livres dos neurônios

aferentes sensoriais, denominadas nociceptores, os quais são amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras, sendo a pele o tecido que recebe a maioria dos estímulos nociceptivos periféricos (JULIUS, BASBAUM, 2001).

Existem duas classes principais de nociceptores. A primeira inclui fibras C não-mielinizadas de pequeno diâmetro e condução lenta e a segunda classe engloba fibras mielinizadas ($A\delta$) de diâmetro médio e condução mais rápida (JULIUS, BASBAUM, 2001; WOOLF, MA, 2007). Essas fibras aferentes mielinizadas diferem consideravelmente das fibras $A\beta$ de grande diâmetro e condução rápida que respondem à estimulação mecânica inócua (BASBAUM et al., 2009). Dentre as fibras nociceptivas, há uma sub-população chamada nociceptores silenciosos (*"silent or sleeping" - nociceptors*), que normalmente não são responsivos a estímulos. Entretanto, a sensibilização desses nociceptores pode ser induzida por diferentes mecanismos, tais como, mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), hipóxia ou lesão tecidual seguida de inflamação (estímulo nocivo químico). Uma vez sensibilizados, esses nociceptores silenciosos podem ser facilmente ativados, podendo inclusive apresentar atividade espontânea (JULIUS, BASBAUM, 2001). Esse processo é característico das dores de origem inflamatória e é amplamente dependente de mediadores químicos liberados pelos neurônios sensoriais e simpáticos e por células não neuronais como plaquetas, células sangüíneas, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células de Schwann (BESSON, 1999). Entre eles destacam-se os metabólitos derivados do ácido araquidônico (PGs e leucotrienos), peptídeos [BK, taquicininas, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), substância P (SP), colecistocinina, peptídeo intestinal

vasoativo], aminas, óxido nítrico (NO), adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), fator de crescimento neural (NGF), fator de ativação plaquetário, citocinas, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a interleucina 1-beta (IL-1 β), e íons como potássio e hidrogênio (BEDBROOK, 1976; PIOTROWSKI; FOREMAN, 1986). Grande parte desses mediadores atua através da interação com receptores acoplados a proteínas G, desencadeando alterações bioquímicas nas células alvos, mediadas por segundos mensageiros, como o AMPc, guanosina monofosfato-cíclico (GMPc), inositol trifosfato (IP₃), DAG e Ca⁺⁺. Estes eventos iniciais induzem a ativação secundária de diferentes quinases intracelulares tais como pKA e pKC, amplamente envolvidas nas mudanças bioquímicas que medeiam o processo de sensibilização do nociceptor primário (DRAY, 1995).

2.3 Prostaglandinas

As PGs estão entre os mais importantes mediadores inflamatórios responsáveis pela sensibilização dos neurônios nociceptivos primários e, conseqüentemente, pela dor inflamatória. Prova irrefutável disso é a eficácia analgésica dos AINES, que ainda são os fármacos mais utilizados para tratamento e controle da maioria das condições dolorosas e cujo principal mecanismo de ação depende da inibição da síntese enzimática de PGs.

As PGs são substâncias orgânicas extremamente versáteis que aparecem numa grande variedade de tecidos e situações biológicas. Por terem sido primeiramente descobertas e isoladas do líquido seminal, como secreção da próstata, foram assim denominadas, sendo o sufixo “glandinas” associado à glândula (HAFEZ, HAFEZ, 2004). Alguns anos mais tarde, as pesquisas mostraram que quase todas as PGs seminais eram originadas nas vesículas seminais e não na

próstata, mas o nome permaneceu. Atualmente sabe-se que as PGs estão presentes em todos os tecidos animais, exercendo várias funções bioquímicas em processos fisiológicos e patológicos. Entre elas, vasodilatação ou vasoconstrição, contração ou relaxamento da musculatura brônquica e uterina; ovulação; aumento do fluxo sanguíneo renal; proteção da mucosa gástrica e inibição da secreção ácida estomacal; resposta imunológica (ex: inibição da agregação plaquetária); regulação de atividade quimiotática; progressão metastática; função endócrina entre outras (DANET- DESNOYER, WETZEL, THATCHER, 1994; COHN et al., 1997; OKUDA, MIYAMOTO, SKARZYNSKI, 2002). Quimicamente fazem parte de um grupo chamado eicosanóides, derivado do ácido araquidônico, que sofre ciclização por ação da enzima cicloxigenase (COX), formando um anel pentano e recebendo várias insaturações. São divididas de acordo com sua estrutura e função, produzindo efeitos biológicos diferentes. Possuem quatro grandes grupos: A, B, E, F (MARQUES, 2006).

As PGs, assim como os leucotrienos, têm sua síntese desencadeada por estímulos nas membranas celulares, que podem ser de natureza fisiológica, farmacológica ou patológica. Tais estímulos ativam a fosfolipase A2 (PLA₂) que hidrolisa fosfolipídios da membrana, particularmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, “liberando” assim o ácido araquidônico. Este ácido liberado é então substrato para duas vias enzimáticas, a da COX, que desencadeia a síntese das PGs e dos tromboxanos, e a via da lipoxigenase (LOX), responsável pela síntese dos leucotrienos (SCHUSTER, 1998, 2002; BAO et al., 2002; MARQUES, 2006).

O sítio catalítico das COX é um canal hidrofóbico que se encontra numa estrutura entre α hélices associadas à membrana. Desta maneira, o ácido

araquidônico não precisa abandonar a membrana para servir como substrato. A síntese das PGs inicia-se com a COX catalisando a adição de oxigênio molecular ao ácido araquidônico, formando-se um produto intermediário, o PGG ou prostaglandina G_2 . No outro lado da membrana, a COX cumpre sua função como peroxidase, reduzindo a PG_2 a PGH_2 . Estas PGs primárias, por assim dizer, são o substrato para formação das diversas PGs com atividade, como PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ e prostaciclina (PGI_2) (COHN et al., 1997; OKUDA et al., 2002).

A maior parte dos receptores para PGs são receptores de membrana clássicos, acoplados à proteínas “G”, mas há também receptores localizados no núcleo, cujos ligantes atuam controlando a expressão gênica celular. Recentemente, foi demonstrado que eicosanóides como a PGI_2 (e outras da série J) e leucotrieno B4 são ligantes endógenos de uma família de receptores ativadores de proliferação do peroxissomo PPARs -*Peroxisome – Activated Receptors*, que regulam o metabolismo lipídico e a diferenciação e proliferação celular. Atualmente, se conhecem 3 isoformas destes receptores, denominados α , δ e γ (DANET-DESNOYER, WETZEL, THATCHER, 1994). A sensibilização do nociceptor primário induzida pela PGE_2 é dependente da ativação dos receptores de prostaglandina (EP_1 , EP_2 , EP_3 e EP_4), que pertencem a super família de receptores acoplados a proteína G. Desta forma, dependendo de qual receptor EP é ativado, podemos ter diferentes vias de sinalização a partir de diferentes proteínas G (NARUMIYA, SUGIMOTO, USHIKUBI, 1991; NARUMIYA, FITZGERALD, 2001; BREYER et al., 2001). Por exemplo, a proteína Gq ativa a via da PLC, enquanto que a ativação de uma proteína Gs leva a ativação da via AC/AMPC (ALEY, LEVINE, 1999; WANG et al., 2008). Assim, a ativação do receptor EP_1 , normalmente ativa a PLC, embora possa ativar também a AC (MORIYAMA et al., 2005). Por sua vez a PLC promove a

hidrólise do fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2) em DAG, que ativa a pKC e IP_3 (que induz aumento do Ca^{++} intracelular) (DANET- DESNOYER, WETZEL, THATCHER, 1994; OKUDA, MIYAMOTO, SKARZYNSKI, 2002). A ativação dos receptores EP_2 e EP_4 ativa a proteína Gs que ativa a AC, o que por sua vez, induz a formação de AMPc (KOBAYASHI, NARUMIYA, 2002). Já a ativação do receptor EP_3 está associada a diversas variantes em suas vias de sinalização, que parecem envolver complexas interações de inibição da proteína G_s e ativação da G_{13} (HATAE, SUGIMOTO, ICHIKAWA, 2002); (HATA, BREYER, 2004).

2.4 Canais TRP (Receptores de Potencial Transitório)

Como mencionado acima, a fibra nervosa aferente primária detecta estímulos ambientais e transduz essa informação na linguagem do sistema nervoso, ou seja, potenciais elétricos (BASBAUM et al., 2009). Na última década, muitas moléculas de transdução da informação nociceptiva têm sido identificadas e o maior grupo de detectores de estímulos nocivos é a família de receptores ionotrópicos de potencial transitório (CHENG et al., 2008; PATAPOUTIAN, TATE, WOOLF, 2009). Os receptores de potencial transitório (TRPs) são expressos em células excitáveis e não excitáveis e representam vias primárias de entrada de íons. O primeiro receptor TRP foi identificado como um componente central do complexo de foto-transdução da mosca drosófila (COSENS et al., 1971). A família dos canais TRP em mamíferos contém 28 membros, os quais podem ser agrupados nas seguintes subfamílias TRPCs (clássicos ou canônicos), TRPVs (vanilóides), TRPMs (melastatínicos), TRPPs (policistínicos), TRPMLs (mucolipínicos), TRPAs (anquirínicos) e TRPNs (NOMP: no mechano-potential) (NILIUS, VOETS., 2005; MINKE, 2006).

Esses receptores participam na geração de sensações dolorosas evocadas por estímulos químicos, térmicos e mecânicos (LEVINE, ALESSANDRI-HABER, 2007). Canais TRP são proteínas extremamente versáteis e impressionantes, por contribuírem para um grande número de processos fisiológicos através de sua capacidade de reconhecer uma grande quantidade e variedade de estímulos físicos e químicos (JULIUS, BASBAUM, 2001; RAMSEY, DELLING, CLAPHAM, 2006). Esta habilidade para funcionar como um receptor polimodal, representa o mecanismo pelo qual os canais TRP conseguem integrar informações do meio ambiente e estímulos endógenos (TREVISANI et al., 2007). O receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) e o TRPA1 são os dois principais representantes dessa categoria de canais, quando consideramos a capacidade de detectar estímulos térmicos e químicos em virtude de lesão tecidual e/ou inflamação.

2.4.1 Receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 – (TRPV1)

Devido às suas propriedades na transdução de estímulos sensoriais a subfamília TRPV (1 a 6) tem recebido crescente atenção. Os membros deste grupo apresentam sensibilidade a diversos estímulos ambientais, nocivos ou não, derivados vegetais, mediadores inflamatórios, calor, prótons, estímulos osmo-sensoriais e mecano-sensoriais.

O TRPV1 (Figura 1), originalmente chamado de receptor vanilóide 1 (VR1) sensível a capsaicina, foi o primeiro descrito como receptor polimodal ativado por compostos vanilóides, calor nocivo ($\geq 43^{\circ}\text{C}$) e pH baixo ($< 5,9$) (CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998). A capsaicina, o princípio ativo da pimenta vermelha do gênero *Capsicum*, é um irritante natural, como o olvanil, o eugenol e a resiniferatoxina (coletivamente denominados vanilóides), que induzem nocicepção

ativando receptores específicos em terminações nervosas. Diversos trabalhos têm mostrado que o TRPV1 também é ativado pela cânfora, alicina, NO, toxinas de aranha e mediadores lipídicos como endovanilóides e produtos da LOX (leucotrieno B₄, LTB₄); sensibilizado pelo etanol, nicotina e citocinas pró-inflamatórias e modulado por cátions extracelulares (ZYGMENT et al., 1999; HWANG et al., 2000; TREVISANI et al., 2002; LIU et al., 2004; AHERN et al., 2005; MACPHERSON et al., 2005; XU, BLAIR, CLAPHAM, 2005; MACPHERSON et al., 2006; SIEMENS et al., 2006; YOSHIDA et al., 2006). A despolarização de nociceptores polimodais C em mamíferos, por influxo de íons através de canais vanilóides, causa liberação neuronal de SP e outros neuropeptídeos, como o CGRP, a somatostatina e o peptídeo intestinal vasoativo (KALIL-GASPAR, 2003).

O TRPV1 é expresso em mais de 50% em fibras do tipo C dos gânglios da raiz dorsal e trigeminal, sendo mais prevalentes em neurônios de diâmetro pequeno à médio expressos em fibras peptidérgicas e não peptidérgicas (TOMINAGA et al., 1998; GUO et al., 1999). Um aspecto importante do funcionamento do TRPV1 é a sua sensibilização por um ou mais estímulos e/ou por compostos endógenos. A exposição de células que expressam TRPV1 a um meio ácido sensibiliza o receptor à ativação por calor, reduzindo seu limiar. Do mesmo modo, prótons sensibilizam o receptor aos efeitos da capsaicina (CALIXTO et al., 2005).

O TRPV1 também é expresso no SNC de mamíferos, onde em condições fisiológicas, dificilmente é ativado por pH baixo ou calor, o que sugere uma regulação preferencial por ligantes endógenos, os chamados endovanilóides. Este grupo compreende a anandamida, N-araquidonoildopamina e os produtos da lipoxigenase (15-HPETE e 12-HPETE) (CALIXTO et al. 2005). Esta habilidade de integrar vários estímulos faz com que o TRPV1 seja um promissor alvo para o

desenvolvimento de novos fármacos para o controle da dor. Esta expectativa é baseada em estudos recentes que demonstraram que há um aumento da expressão do TRPV1 em tecidos obtidos de pacientes afetados com condições patológicas como doenças inflamatórias e carcinoma (TYMPANIDIS et al., 2004, *apud* CALIXTO et al., 2005).

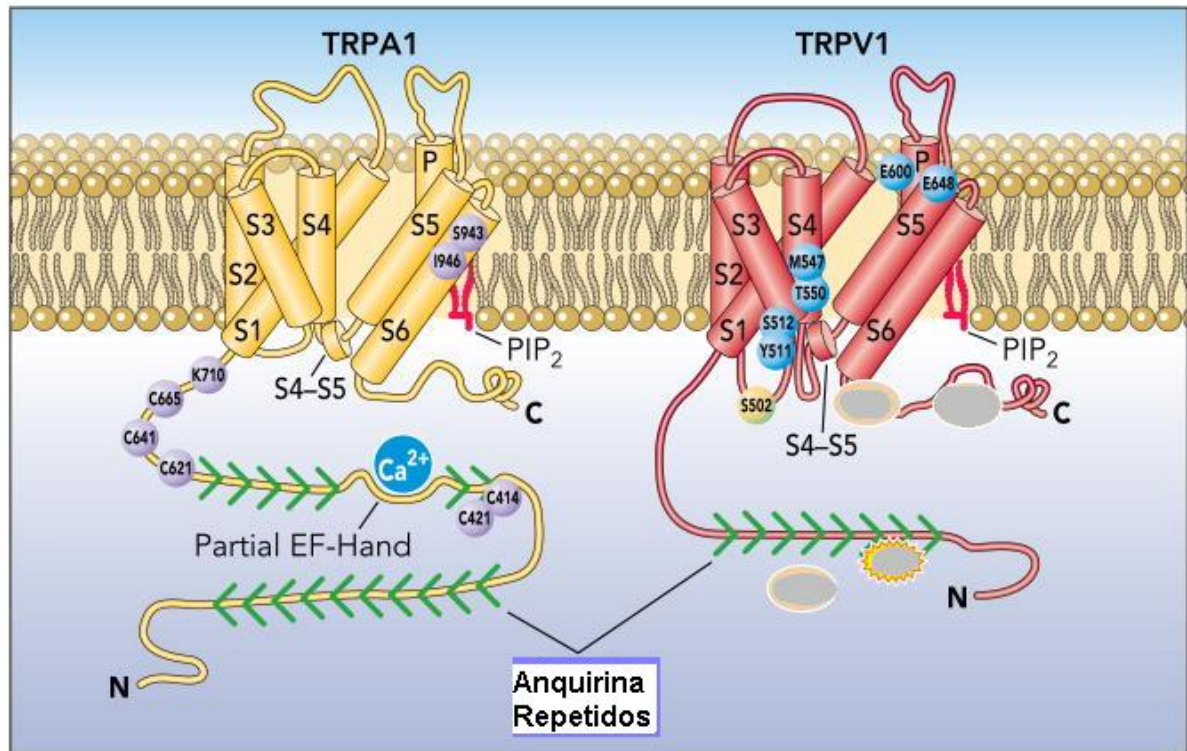
Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que diferentes mediadores inflamatórios como BK, glutamato, PGE₂ ou NGF são capazes de sensibilizar e estimular o TRPV1 indiretamente através da ativação da PLC, com conseqüente ativação da pKC ou da PLA₂, culminando com a ativação da pKA (CESARE et al., 1999; PREMKUMAR; AHERN, 2000; CHUANG et al., 2001; HU, BHAVE, GEREAU., 2002; FERREIRA, DA SILVA, CALIXTO., 2004; CHUANG et al 2001; GATTI et al., 2006; GU, LEE, 2006; SHIM et al., 2007) (Figura 3). O mecanismo molecular (ou mecanismos) que envolve a sensibilização e ativação do TRPV1, não é totalmente conhecido e provavelmente envolva a ativação de outros canais em conjunto com o TRPV1 (DUNN, RANG, 1990; KOLLARIK; UNDEM, 2004). De fato, Bautista et al (2006), comprovaram que ambos (TRPV1 e TRPA1), são necessários no desenvolvimento da hiperalgesia térmica mediada pela BK.

2.4.2 Receptor de potencial transitório anquirina 1 – (TRPA1)

O receptor TRPA1 (chamado anteriormente de ANKTM1) parece ser expresso preferencialmente em neurônios nociceptivos primários (BANDELL et al., 2004; BAUTISTA et al., 2006), sendo caracterizado por seqüências do tipo anquirina repetidas em seu N-terminal (14 NH₂) (Figura 1). O receptor TRPA1 não é expresso em neurônios altamente mielinizados, mas está presente em neurônios que contêm o CGRP e a substância P, sugerindo sua expressão por fibras A δ e C sensíveis à

estímulação nociva (STORY et al., 2003). Além de neurônios do gânglio da raiz dorsal, o receptor TRPA1 também é expresso em neurônios do gânglio do nervo trigêmeo e do gânglio nodoso (NAGATA et al., 2005). Estudos quantitativos realizados em camundongos adultos demonstraram que o TRPA1 é expresso em 56% dos neurônios do gânglio da raiz dorsal, 36% dos neurônios do gânglio do nervo trigêmeo e 28% dos neurônios do gânglio nodoso. O receptor TRPA1 não é expresso somente nos corpos celulares de neurônios sensoriais, mas também em terminações periféricas como aquelas que inervam a bexiga urinária (NAGATA et al., 2005). Além dos neurônios sensoriais, o RNAm codificador da proteína que compõe o TRPA1 é encontrado em neurônios simpáticos do gânglio cervical superior de camundongos (SMITH et al., 2004) e em células ciliadas que formam a membrana basilar da cóclea (NAGATA et al., 2005). Estudos de eletro-fisiologia e imunodeteção mostram que o TRPA1 é seletivamente expresso em uma subpopulação de fibras nociceptivas peptidérgicas do tipo C que expressam o receptor TRPV1 (INOUE; BRYANT, 2005). Essa co-expressão do TRPA1 com o TRPV1 reforça o envolvimento mútuo e/ou sinergia de diferentes mecanismos envolvendo os dois receptores (BAUTISTA et al., 2005; STORY et al., 2003). A ativação dos canais TRPA1, da mesma forma que o TRPV1, também é capaz de despolarizar os nociceptores polimodais C e causar a liberação central e periférica de neuropeptídeos (como SP e CGPR), que medeiam a transmissão da informação nociceptiva e a inflamação neurogênica respectivamente (CATERINA et al., 1997; GEPPETT, HOLZER, 1996). O alil isiotiocianato é o principal agonista do receptor TRPA1 utilizado em estudos experimentais, de forma semelhante a capsaicina, que ativa o TRPV1, induz nocicepção espontânea, hiperalgesia mecânica e térmica e

inflamação neurogênica (BAUTISTA et al., 2006; JANCOS, JANCOS-GABOR, SZOLCSANYI, 1967).



Fonte: Adaptado de Bessac, Jordt, Physiology (Bethesda), 2008.

Figura 1: Estrutura Molecular do Receptor TRPA1 e TRPV1, demonstrando seus sítios regulatórios. Representação do TRPA1 (esquerda) demonstrando as regiões transmembranas e loops internos e externos. Representação do TRPV1 (direita) demonstrando as regiões transmembranas e as alças internas e externas. A sequência das regiões transmembrana é indicada pela codificação de S1 a S6. O domínio citoplasmático apresenta a sequência dos N-terminal anquirina repetidos. A representação do receptor TRPA1 mostra os vários resíduos de cisteína e lisina que parecem desempenhar papel fundamental para promover a ligação com os agonistas, o que levaria a sua sensibilização e/ou ativação. Mostra também o domínio *EF-hand* relacionado ao mecanismo de ativação dependente de Ca^{2+} . Interações elétricas com o C-terminal do TRPA1 e TRPV1 podem servir como sítios de interação para o PIP_2 (substrato da PLC), exercendo um efeito inibitório no funcionamento dos canais. A modelagem das estruturas dos canais TRPA1 e TRPV1, foi feita após exposição ao Raio-X da estrutura do cristal do canal de potássio (Kv1.2), um canal que pertence a mesma super-família de canais de cátion.

Desde que o óleo de mostadarda (alil isiotiocianato) (JORDT et al. 2004) foi descoberto como o principal agonista do TRPA1, a identificação de substâncias capazes de ativá-lo não para de crescer. Entre elas encontramos várias substâncias picantes como a alicina (MACPHERSON et al., 2005), diversos irritantes químicos, farmacológicos, industriais e naturais, (BANDELL et al., 2004; JORDT et al., 2004; MCNAMARA et al., 2007), bem como substâncias endógenas (TREVISANI et al., 2007). Estudos sobre a estrutura funcional do TRPA1 (HINMAN et al., 2006; MACPHERSON et al., 2007a) justificam o porque de tamanha diversidade entre os agonistas, pois sugerem que o TRPA1 é ativado diretamente através de ligações covalentes entre substâncias eletrofílicas e proteínas específicas do canal (cisteína). De fato, muitos desses agonistas são quimicamente instáveis e capazes de sofrer reações químicas com proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e produtos do metabolismo (HINMAN et al., 2006). Devido a esse grande número de possíveis ativadores, o TRPA1 emerge como um receptor importante nos processos nociceptivos relacionados as condições inflamatórias (BANDELL et al. 2004; DAI et al. 2007; MACPHERSON et al. 2007b; MCNAMARA et al. 2007; PETRUS et al. 2007; ANDRADE et al. 2008; WANG et al. 2008).

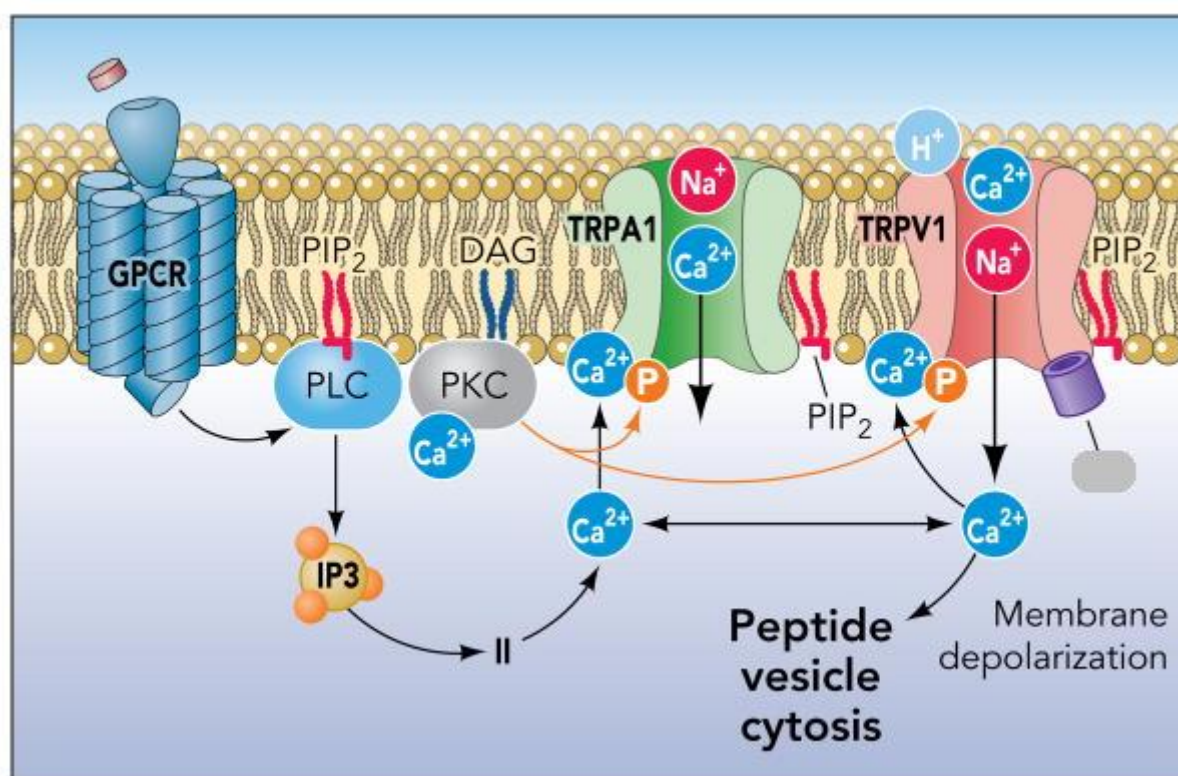
Entre as substâncias endógenas que ativam diretamente o TRPA1, alguns destacam-se devido sua importância fisiológica. Por exemplo, o HNE (MACPHERSON et al., 2007b; TREVISANI et al., 2007), um aldeído endógeno produzido em altas concentrações através da peroxidação dos fosfolipídios de membrana em resposta a lesão tecidual e inflamação (Figura 2). O HNE é a mais abundante e reativa espécie carbônica, gerada através da peroxidação do ômega 6 (ácidos de gorduras polinsaturados), tais como o ácido linoléico e ácido aracdônico (ESTERBAUER, SCHAUR, ZOLLNER, 1991). Produzido em resposta a lesões

oxidativas, o HNE tem sido considerado em diversos estudos como um mediador importante em muitos dos efeitos tóxicos produzidos pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) in vivo (ESTERBAUER, SCHAUER, ZOLLNER., 1991), que somando-se a sua característica físico-química de ser altamente difusível, pode contribuir para a formação de radicais livres longe do local da lesão inicial (ESTERBAUER, SCHAUER, ZOLLNER, 1991; UCHIDA, STADTMAN., 1993). Outro exemplo são as PGs das séries A e J, que em virtude de suas características eletrofílicas, podem ativar diretamente o TRPA1 (CRUZ-ORENGO et al., 2008; TAYLOR-CLARK et al., 2008). Essas PGs (PGA₂, PGA₁ e PGJ₂) são metabólitos formados a partir da PGE₂, PGE₁ e PGD₂, respectivamente e se conhece muito pouco sobre seu papel nos mecanismos nociceptivos. A ação biológica desses metabólitos não é mediada pela ativação clássica de um receptor EP acoplado a proteína G, mas sim através de uma interação direta com proteínas alvo. Uma característica comum a esses metabólitos é que eles possuem um grupo eletrofílico carbonila (*carbonyl*) α,β -insaturado, capaz de realizar reações de adição de Michael (STRAUS, GLASS, 2001), o que levaria através desse mecanismo a uma possível ativação do TRPA1 (TAYLOR-CLARK, 2008). De maneira distinta desses metabólitos de PGs, seus precursores como a PGE₂ que estão entre os principais mediadores da dor inflamatória e são nosso objeto de estudo, não possuem o grupo eletrofílico carbonila (*carbonyl*) α,β -insaturado, e portanto, não são capazes de realizar ativação direta do TRPA1 (TAYLOR-CLARK et al., 2008).

induzida pela administração de BK na pata depende do receptor TRPA1 que é ativado em resposta a ativação da pKA e da via da PLC pelo receptor B2 de BK. As vias da PLC e da AC/AMPc podem ser consideradas as principais vias de sinalização celular responsáveis pela sensibilização do nociceptor primário. Portanto, é fácil supor que o receptor TRPA1 tem papel importante nos mecanismos envolvidos na sensibilização inflamatória.

Outro elemento importante no mecanismo de ativação do TRPA1 são os íons cálcio, que parecem ser essenciais como co-ativadores do TRPA1 (CAVANAUGH, SIMKIN, KIM, 2008; DOERNER et al., 2007; JORDT et al., 2004; NAGATA et al., 2005; WANG et al., 2008; ZURBORG et al., 2007). A remoção do Ca^{++} intra e extracelular reduz drasticamente a potência de ativação do TRPA1 pelo óleo de mostarda e diminui a atividade cinética do canal (JORDT et al., 2004; ZURBORG et al., 2007). Entretanto, na presença do Ca^{++} intracelular, mesmo fracas ativações do canal podem permitir suficiente influxo de Ca^{++} através do TRPA1, aumentando o nível do Ca^{++} intracelular a ponto do Ca^{++} transformar-se no principal estímulo de ativação. Esse mecanismo de feedback positivo pode resultar em um desacoplamento da atividade do TRPA1 da substância química que gerou o estímulo inicial. Receptores TRPA1 na vizinhança do receptor ativado inicialmente podem se tornar ativados através de um mecanismo de “*spillover*” de Ca^{++} , sem que tenham sido modificados por um agonista seletivo. Além do Ca^{++} outros fatores parecem se somar ao complexo sistema de ativação e modulação do TRPA1. Por exemplo, íons intracelulares polifosfatos (PPPi), foram recentemente identificados como um co-fator essencial na ativação do receptor TRPA1 (CAVANAUGH, SIMKIN, KIM, 2008; KIM, CAVANAUGH, 2007).

Portanto, fisiologicamente, o TRPA1 parece ser sensibilizado ou ativado por uma somatória simultânea de mediadores inflamatórios e substâncias oxidantes e eletrofílicas ao invés de um único agonista. Essa idéia relata o conceito de uma “sopa inflamatória”, descrevendo os múltiplos mediadores químicos e biológicos que participam da sensibilização e ativação dos nociceptores primários durante a injúria tecidual e inflamação (MEYER et al., 1991). É possível que a ativação do TRPA1 medie parte importante dos efeitos atribuídos a alguns desses mediadores químicos e biológicos, contribuindo para a instalação e manutenção da hiperalgesia e alodinia inflamatórias.



Fonte: Bessac, Jordt, Physiology (Bethesda), 2008.

Figura 3: Sensibilização e ativação do TRPV1 e TRPA1 por diferentes mediadores pertencentes a cascata de sinalização inflamatória. Esses dois receptores são sensibilizados ou ativados através de diferentes vias de sinalização iniciados a partir ativação da PLC em função de injúria tecidual e inflamação. Neste processo podem participar os receptores da histamina, BK, proteases, NGF. O Ca⁺⁺ intracelular é crucial para ativação do TRPA1, mobilizado principalmente através das reservas intracelulares, permeado através do TRPA1, ou possivelmente através do TRPV1. Fosforilação através da pKC e outras quinases também afetam a atividade dos canais TRP na lesão tecidual e inflamação. Elevados níveis de Ca⁺⁺ também disparam a liberação de neuropeptídeos pro-inflamatórios como SP e CGRP.

2.5 Mecanismos de sinalização celular envolvidos na sensibilização do nociceptor primário.

A função do neurônio primário é modulada por uma ampla variedade de mediadores disponibilizados no espaço extracelular. Esses mediadores ativam um grande número de receptores de membrana, os quais por sua vez, ativam uma variedade de vias de sinalização intracelular em forma de cascata (JULIUS, BASBAUM, 2001; LEWIN, 2004; SCHOLZ, WOOLF, 2002). Apesar disso, a sensibilização do neurônio primário é resultado de alterações específicas tais como a modulação de alguns canais iônicos (HUCHO, LEVINE, 2007). Entender o funcionamento desse sofisticado mecanismo é fundamental para a compreensão da fisiologia da nocicepção e da hiperalgesia.

O AMPc foi o primeiro segundo mensageiro a ser relacionado com a sensibilização periférica. De fato, injeção intradérmica de análogos de AMPc (FERREIRA et al., 1990; TAIWO et al., 1989) ou de ativador da AC (forskolin) (TAIWO, LEVINE, 1991) induz hiperalgesia. Mediadores inflamatórios, como as PGs, induzem hiperalgesia dependente do aumento dos níveis de AMPc (TAIWO, LEVINE, 1991). Esse aumento do AMPc pode modular os canais iônicos e canais operados por ligantes, deixando os mais responsivos aos estímulos (ENGLAND et al., 1996; GOLD et al., 1998). Tanto a indução quanto a manutenção da hiperalgesia dependem de que os níveis de AMPc estejam elevados, uma vez que inibidores de AC diminuem a hiperalgesia mesmo após instalada (ALEY, LEVINE, 1999; TAIWO, LEVINE, 1991). A ativação da pKA é uma consequência natural do aumento do AMPc, sendo que seu bloqueio por antagonista farmacológico ou por inibição genética de pKA atenua a inflamação e a hiperalgesia (ALEY, LEVINE, 1999). Estudos recentes têm mostrado que o aumento de AMPc pode ativar além da pKA,

também canais de cálcio (KAUPP, SEIFERT, 2002) e Epac-1 (GDP/GTP) (ROOIJ et al. 1998). Portanto, essas vias de sinalização também devem ser consideradas a partir da ativação do AMPc.

Existem evidências extensas implicando a pKC nos mecanismos de sinalização que levam à nocicepção e hiperalgesia (SOUZA et al., 2002). A sensibilização do nociceptor, mensurada pela hiperalgesia térmica e mecânica, pode ser induzida pela ativação da pKC (SOUZA et al., 2002), liberação de neuropeptídeos dos terminais periféricos (CESARE et al. 1999) e aumento de canais de sódio resistentes a tetrodotoxina (TTX-R I_{NA}) nas células do glânglio da raiz dorsal (GOLD et al., 1996). A pKC é uma família de quinases de serina/treonina que estão divididas em 3 grupos: as convencionais (c): isoenzimas (α , βI , βII e γ) que são dependentes de Ca^{++} e DAG; as originais (n): isoenzimas (δ , ϵ , η e θ) que são independentes de Ca^{++} mas dependentes de DAG; e as atípicas (a): isoenzimas (ξ e λ/ι) que são independentes de Ca^{++} e DAG (VELAZQUEZ, MOHAMMAD, SWEITZER, 2007). Entre todas, somente a pKC ϵ pode ser ativada pelos mediadores inflamatórios BK, epinefrina, PGs, TNF- α , receptor ativado por protease 2 (PAR-2) (AMADESI et al., 2006; CESARE et al., 1999; KHASAR et al., 1999; OLAH et al., 2002; PARADA et al., 2003). Uma vez ativada, nas fibras aferentes primárias periféricas, a pKC pode fosforilar canais TRPs e canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs), entre outros. Nos terminais centrais dessas fibras, localizados na medula espinhal, a pKC influencia na liberação de neurotransmissores e nos neurônios pós-sinápticos do corno dorsal, regula a atividade de receptores de NK-1, glutamatérgicos e CGRP (VELAZQUEZ, MOHAMMAD, SWEITZER, 2007). Alguns trabalhos recentes têm sugerido que as vias de sinalização no nociceptor primário, que utilizam a pKC ϵ , são dependentes da existência e integridade do cito esqueleto

e dos microdomínios existentes na membrana celular (HUCHO, LEVINE, 2007), o que reforça a idéia de que outros aspectos relacionados a fisiologia celular podem estar envolvidos na sensibilização do nociceptor primário.

Os diversos sinais extracelulares são transmitidos através da membrana celular para ativar alvos bem definidos no compartimento intracelular, embora ainda não esteja claro se esses sinais convergem ou agem de forma independente e paralela para promover a ativação de canais como o TRPV1 e o TRPA1 (HUCHO, LEVINE, 2007). Parece existir uma concordância na maioria dos estudos sobre a participação da pKA, pKC e PLC com relação a ativação e ou sensibilização do TRPV1 e a participação de pelo menos a pKA e PLC com relação ao TRPA1. Além disso, estudos recentes sugerem a participação das proteínas de ancoragem (*scaffolding proteins*) (COLLEDGE, SCOTT, 1999), tais como a proteína âncora A-quinase (*A kinase anchoring protein* – AKAP), que são um grupo de proteínas que têm a função comum de ligação com a sub-unidade reguladora da pKA e de direcionamento para locais específicos dentro da célula. Assim, a AKAP atuaria como um dispositivo de direcionamento que associa elementos de sinalização em um andaime (local específico) que são alvos para microdomínios na membrana celular. Desta forma, esse direcionamento permitiria que substratos possam ser regulados por fosforilação (por pKA) e por desfosforilação (por fosfatases). Assim, a AKAP integraria diversas vias de sinalização celular de forma organizada, prevenindo que o sinal se disperse, propiciando que o sinal atinja um alvo específico e de forma potencializada. Um grande número de canais iônicos são sujeitos a modulação pela AKAP, incluindo receptores de glutamato, canais de cálcio, canais de potássio tipo M (GAO et al., 1997; COLLEDGE et al., 2000; ALTIER et al., 2002; HOSHI, LAGEBERG, SCOTT, 2005; SANDOZ et al., 2006; NAVEDO et al., 2008), o

TRPV1 (ZHANG, LI, MCNAUGHTON, 2008; FAN, LEE, MCNAUGHTON, 2009) e o TRPA1 (FAN, LEE, MCNAUGHTON, 2009). Embora a proteína de âncora A-quinase (AKAP), tenha ganho esse nome por sua habilidade de integrar a pKA com substratos específicos, ela também pode da mesma forma integrar outras quinases, tais como a pKC (COGHLAN et al., 1995; KLAUCK et al., 1996) e fosfatases com seus alvos determinados (SMITH, LANGEBERG, SCOTT, 2006). Assim parece que em última análise, a sensibilização do TRPV1 e provavelmente também do TRPA1 depende da habilidade da pKA (ZHANG, LI, MCNAUGHTON, 2008; FAN, LEE, MCNAUGHTON, 2009) e pKC (ZHANG, LI, MCNAUGHTON, 2008) se ligarem a AKAP, bem como da habilidade da AKAP se ligar a esses canais (ZHANG, LI, MCNAUGHTON, 2008; FAN, LEE, MCNAUGHTON, 2009).

3 PROPOSIÇÃO

A partir das informações observadas na literatura pertinente e dos questionamentos abordados na introdução o primeiro objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de que o receptor TRPA1 media o processo de sensibilização do nociceptor primário induzido por PGE_2 . O segundo objetivo foi estudar o mecanismo responsável pela ativação do TRPA1 durante o processo de sensibilização induzido pela PGE_2 .

1. Para investigar a participação do TRPA1 no processo de sensibilização do nociceptor primário induzido por PGE_2 avaliamos especificamente:
 - Se o bloqueio farmacológico do receptor TRPA1, através da administração de seu antagonista seletivo, afeta a indução e/ou a manutenção da hiperalgesia inflamatória induzida pela PGE_2 .
 - Se a diminuição da expressão do TRPA1 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (L5-L6) induzida pela administração intratecal (i.t.) de ODN-antisense para o receptor TRPA1 diminui a hiperalgesia inflamatória induzida pela PGE_2 .
 - Se a administração de PGE_2 na pata afeta a expressão do TRPA1 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (L5-L6).
2. Para identificar o mecanismo responsável pela ativação do TRPA1 durante o processo de sensibilização induzido pela PGE_2 avaliamos em que estágio dos eventos intracelulares induzida pela PGE_2 ocorre a ativação do TRPA1. Para isso, avaliamos especificamente:

- Se o bloqueio farmacológico do receptor TRPA1 afeta a hiperalgesia inflamatória induzida pelo AMPc.
- Se o bloqueio farmacológico do receptor TRPA1 ou a diminuição de sua expressão nos neurônios do gânglio da raiz dorsal afeta a hiperalgesia inflamatória induzida pela subunidade catalítica da pKA.
- Se o bloqueio farmacológico do receptor TRPA1 ou a diminuição de sua expressão nos neurônios do gânglio da raiz dorsal afeta a hiperalgesia inflamatória induzida pelo ativador da pKCe.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar pesando entre 180 e 250 g, mantidos em gaiolas plásticas (cinco por gaiola) contendo maravalha, em ambiente com controle de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12hs) e de temperatura ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) com alimentação e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Paraná (protocolo 366) e estão de acordo com as diretrizes propostas pela Associação Internacional para Estudo da Dor (ZIMMERMANN, 2001).

4.2 Drogas e anticorpos

Prostaglandina E_2 (PGE_2 , 100ng) (SACHS et al., 2009); antagonista do receptor TRPA1 HC 030031 (HC), (dose inicial 300 μg - RO et al., 2009 e dose final 1200 μg); N6,2'-O-dibutyryladenossina 3':5'-cyclic monophosphate (db-cAMP, 100 μg) (SACHS et al. 2009) foram adquiridos da Sigma – Aldrich (St Louis, MO, USA). $\psi\text{εRACK}$, pseudo receptor para $\text{pKC}\epsilon$ ativada (9 μg , SACHS et al., 2009) foi adquirido da SynPep Corp (Dublin, CA, USA). A subunidade catalítica da pKA (pKAcs , 9 e 24U) (SACHS et al., 2009) foi adquirida da Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Todas as doses foram dissolvidas em NaCl 0,9%, exceto o HC que foi dissolvido puro DMSO (dimetilsulfóxido).

ODN-antisense (5'- TATCGCTCCACATTGCTAC -3') e mismatch (5'- ATTCGCCTCACATTGTCAC -3') para o TRPA1 foram manufaturados pela Erviegas (São Paulo – SP Brasil); anticorpo para o receptor TRPA1 para Western Blot foi adquirido da Abcam (UK, USA).

4.3 Teste comportamental de hiperalgesia mecânica

As medidas de hiperalgesia foram realizadas 0, 1, 3, 6 e 24 horas após a injeção intraplantar (i.pl.). O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado pelo método de Von Frey eletrônico e utilizado como medida da hiperalgesia inflamatória (Insight, Ribeirão Preto – SP, Brasil) (Figura 4). Para adaptação, os ratos foram colocados numa sala silenciosa em caixas de acrílico (12 x 12 x 17 cm) (Figura 4) com assoalho de arame, 15 minutos antes de começar a avaliação. Durante o período de adaptação, as patas foram testadas três vezes. O teste consistiu em evocar um reflexo de retirada da pata induzida pela força de um transdutor adaptado e conectado a uma ponteira a qual possui uma ponta de 0,7 mm² calibre (filamento de Von Frey eletrônico; IITC Life Science, Wood-land Hills, CA). Um espelho inclinado posicionado debaixo das caixas de acrílico permitiu uma visualização mais clara da face plantar das patas traseiras. O estímulo foi aplicado três vezes na pata, e a resposta do animal, para aquele determinado tempo, foi considerada a média destas três aplicações. Na ausência da resposta a 60 g, este valor foi anotado como limiar de resposta do animal (medida de corte). O animal foi testado antes e depois de cada tratamento, nos tempos pré-determinados. O resultado foi expresso pela diferença entre o valor basal (média das medidas pré- tratamento) e a resposta em cada tempo pós-tratamento (média das medidas pós- tratamento para determinado tempo), ou seja, foi obtido um valor “ Δ ” (delta) calculado pela subtração dos valores obtidos depois do tratamento.



Figura 4: Aparelho de Von Frey eletrônico e Caixas acrílicas

4.4 Nocicepção

Três horas antes do teste comportamental de nocicepção, os animais receberam injeção intraplantar de PGE₂ (100 ng) ou salina (NaCl 0,9%). Antes do experimento, cada animal foi colocado na câmara de observação (30x30x30 cm, com base e laterais espelhadas e frente de vidro) para um período de ambientação de 15 minutos. Ao fim desse período, cada animal recebeu uma injeção intraplantar de capsaicina (0,5 µg) e HC 030031 (1200 µg) ou seu veículo dimetilsulfóxido (DMSO). As injeções foram realizadas com agulha 30 G conectada a uma seringa de microlitro Hamilton por uma cânula de polietileno e o volume total foi de 30µl. O comportamento nociceptivo caracterizado pelo rápido levantamento da pata que recebeu a injeção (*finch* da pata) foi quantificado, com auxílio de um contador de células, durante 15 minutos divididos em blocos de 5 minutos. O número de *flinches* de pata durante a duração do teste foi utilizado na análise estatística, como medida quantitativa de nocicepção.

4.5 Administração intratecal de ODN-antisense

A administração Intratecal foi realizada segundo a técnica descrita por Papir-Kricheli et al. (1987), sob anestesia induzida pela inalação de halotano. Após a tricotomia da região lombar, os animais foram posicionados de maneira que a coluna vertebral ficasse arqueada, então uma agulha hipodérmica número 26 foi inserida no espaço subaracnóide da medula entre a região sacral e da cauda eqüina, perfurando a região medial entre L5 e L6 num ângulo de aproximadamente 45°. O volume administrado foi 10 µl e a velocidade de administração foi de aproximadamente 1µl/s. A administração intratecal de mismatch ou ODN-antisense (5 noml por dia) foi realizada por 4 dias anteriores ao experimento, período suficiente para induzir

diminuição significativa (*knock down*) da expressão desse receptor em células dos gânglios da raiz dorsal (KATSURA et al., 2006).

4.6 Western Blot

A quantificação da expressão do receptor TRPA1 em células do gânglio da raiz dorsal (L5 e L6) pela técnica de Western Blot foi utilizada para confirmar a diminuição da expressão desse receptor induzida pela administração intratecal de antisense e para verificar se a administração de PGE₂ na pata aumenta a expressão desse receptor.

Sob anestesia geral os animais foram submetidos à perfusão cardíaca com solução NaCl 0,9%. Os gânglios das raízes dorsais L5-L6 foram removidos e acondicionados a temperatura de – 70°C. No dia da análise, o tecido foi homogeneizado em 2ml de tampão TAPS contendo sucrose (0,25M), imidazol (3mM) e uma combinação de inibidores de proteases (2µg/ml de aprotinina, 2mM de fenilmetilsulfonil fluoreto, 50µg/ml de leupeptina), mantido em um banho com gelo, utilizando um sonicador (Branson Sonifier, modelo 185; Danbury, CT, USA) operado em velocidade máxima por 30 segundos. A quantificação da proteína total nos extratos foi realizada através do método do Kit BCA, Pierce. As amostras do extrato protéico foram tratadas com tampão Laemmli contendo 100 mM de DTT e aquecidas a 65°C por 15 min. Em seguida, 25 a 50µg de proteína foram aplicados em gel de poliacrilamida 8% em um aparelho para eletroforese da marca Novex ou Biorad. Marcadores de proteínas (Novex), incluindo miosina (205Kd), BSA (98 Kd), desidrogenase glutâmica (64 Kd), anidrase carbônica (36 Kd), mioglobina (30 Kd), lisosima (16 Kd), aprotina (6kd) e cadeia da insulina (4Kd), foram paralelamente submetidos à eletroforese para estimar o peso molecular. A eletroforese de

proteínas em gel de nitrocelulose foi realizada por eletroeluição a 30V por 75 minutos. A ligação não específica de proteínas no papel de nitrocelulose foi reduzida pela pré-incubação das membranas em um bloqueador contendo leite desnatado a 5%, por 30 minutos. A membrana foi subsequenteiramente incubada a 4⁰C, por uma noite, usando anticorpo específico para o receptor TRPA1, (Goat anti-TRPA1 Polyclonal antibody). Na manhã seguinte os “blots” foram lavados em tampão de lavagem (50 mM Na₂PO₄, 150 mM NaCl e 0,05% de Tween 20) por 60 min e, em seguida incubados à temperatura ambiente, por 1h, com anticorpo anti-imunoglobulina, de cabra, conjugado a peroxidase (DAKO, Carpinteria, CA, USA). Nova lavagem foi realizada como descrito acima. Para detectar as bandas imunorreativas, os “blots” foram expostos à solução de quimioluminescência (LumiGlo chemiluninescence substrate, Kirkegard and Perry Gaithersubrg, MD. USA) por 1 min, seguido de exposição a um filme de raio X-OMAT AR (Eastman Kodak Co, Rochester, NY, USA). Após a revelação do filme os “blots” foram lavados com tinta da índia (1µl/100ml) por 2h para visualizar as bandas de proteínas e confirmar a equivalência das mesmas. As densidades das bandas e das amostras sobre filme foram escaneadas e “salvas” em discos de computador para posterior quantificação da densitometria ótica, usando o sistema de imagem NIH Programa 1,57. A expressão de alfa-tubulina foi utilizada como controle positivo da expressão do receptor TRPA1 para cada amostra.

4.7 Delineamento experimental

Todas as drogas foram administradas na pata, exceto o antisense e mismatch que foram administrados no espaço subaracnóide na região lombar (L5 - L6), e suas doses iniciais foram baseadas em estudos prévios da literatura.

Para verificar se o bloqueio farmacológico do receptor TRPA1 afeta a indução da hiperalgesia inflamatória induzida por PGE₂, avaliamos a resposta hiperalgésica em animais que receberam os seguintes tratamentos:

Grupos 1 e 2 - Co-administração de PGE₂ (100 ng) ou NaCl 0,9% + DMSO (veículo do HC 030031), 25 ml de cada uma, com volume total de 50 ml.

Grupos 3 e 4 - Co-administração de PGE₂ + HC 030031(HC), 300µg ou 1200 µg, 25 ml de cada uma, com volume total de 50 ml.

Para verificar se o bloqueio farmacológico do receptor TRPA1 afeta a manutenção da hiperalgesia inflamatória induzida por PGE₂, avaliamos a resposta hiperalgésica em animais que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 5 - PGE₂ (100 ng), 2 horas e 55 minutos depois DMSO, 25 ml de cada uma, com volume total de 50 ml.

Grupos 6 - PGE₂ (100 ng), 2 horas e 55 minutos + HC (1200 µg), 25 ml de cada uma, com volume total de 50 ml.

Para verificar se a diminuição da expressão do TRPA1 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (L5-L6) diminui ou bloqueia a hiperalgesia inflamatória induzida por PGE₂ avaliamos a resposta hiperalgésica em animais que receberam os seguintes tratamentos:

Grupos 7 e 8 – Administração Intratecal por quatro dias de antisense (10 ml) ou mismatch (10 ml) para o TRPA1 e administração intraplantar de PGE₂ (100 ng) no dia do experimento. Além do teste comportamental de hiperalgesia mecânica, a

diminuição da expressão do receptor em células do gânglio da raiz dorsal foi confirmada por western blot.

Para verificar se a administração de PGE_2 na pata aumenta a expressão do TRPA1 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal avaliamos a expressão do receptor TRPA1, por western blot, em animais que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 9 e 10- PGE_2 (100 ng) ou NaCl 0,9%+ DMSO (veículo do HC 030031), 25 ml de cada uma, com volume total de 50 ml.

Alguns trabalhos na literatura demonstraram que o TRPA1 pode ser ativado por estímulos mecânicos (WALKER et al., 2000; TRACEY et al., 2003; KWAN et al., 2009). Como utilizamos um teste comportamental onde um estímulo mecânico é aplicado nas patas dos ratos para avaliar a hiperalgesia inflamatória, foi necessário excluir a possibilidade de que a PGE_2 sensibilizasse o TRPA1 apenas ao estímulo mecânico. Portanto, utilizamos um estímulo químico para evidenciar a sensibilização do TRPA1 mediada pela PGE_2 , com essa finalidade, injetamos uma baixa dose de capsaicina como estímulo químico, uma vez que ela é capaz de ativar diretamente fibras nociceptivas C. O comportamento nociceptivo espontâneo foi avaliado por 15 minutos.

Para verificar se a PGE_2 sensibiliza o TRPA1 a estimulação química avaliamos a resposta nociceptiva comportamental espontânea em animais que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 11 e 12 – NaCl 0,9% ou capsaicina (0,5 μ g).

Grupo 13 - PGE_2 (100 ng) (3 horas antes) + Capsaicina (0,5 μ g).

Grupo 14 - PGE_2 (100 ng) (3 horas antes) + co-administração HC (1200 μ g) + Capsaicina (0,5 μ g).

Grupo 15 - Capsaicina (0,5 μ g) + HC (1200 μ g).

Para verificar se o bloqueio farmacológico do receptor TRPA1 pela administração de seu antagonista (HC) ou a diminuição da expressão do receptor através da administração de antisense para o TRPA1, afeta o limiar nociceptivo mecânico, avaliamos esse limiar em animais que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 16 – NaCl 0,9% + HC (1200 µg), 25 ml de cada uma, com volume total de 50 ml.

Grupo 17 – NaCl 0,9% + Antisense (5ng) (10 ml) (i.t.)

Para avaliar e comparar o efeito da hiperalgesia inflamatória induzida pela PGE₂ com os diferentes mediadores exógenos participantes da cascata de eventos intracelulares induzida pela PGE₂, avaliamos a resposta hiperalgésica em animais que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 18 - db-cAMP (100 µg) + DMSO, 25 ml de cada uma, com volume total de 50 ml.

Grupo 19 – pKAcs (9 e 24U) + DMSO, 25 ml de cada uma, com volume total de 50 ml.

Grupo 20 – pKCε (9 µg) + DMSO, 25 ml de cada uma, com volume total de 50 ml.

Para verificar em que estágio da cascata de eventos intracelulares induzida pela PGE₂ ocorre a ativação do TRPA1, avaliamos a resposta hiperalgésica em animais que receberam os seguintes tratamentos:

Grupos 21 e 22- Co-administração de db-cAMP (100 µg) + HC ou DMSO, 25 ml de cada uma, com volume total de 50 ml.

Grupos 23 e 24 - Co-administração da pKAcs (24U) + HC ou DMSO, 25 ml de cada uma, com volume total de 50 ml.

Grupos 25 e 26- pKAcs (24U) (25 ml) + antisense (10 ml) ou mismatch (10 ml) para o TRPA1

Grupos 27 e 28 - Co-administração de pKCε (9 µg) + HC ou DMSO, 25 ml de cada uma, com volume total de 50 ml.

Grupos 29 e 30- pKCε (9 µg) (25 ml) + antisense (10 ml) ou mismatch (10 ml) para o TRPA1.

4.8 Análise estatística dos resultados

Os dados apresentados sob a forma de curva temporal (figuras 5A e 9) foram analisados por Two – Way ANOVA (análise de variância), seguido do teste post-hoc de Tukey, com o objetivo de avaliar as interações tempo vs. tratamento. Os dados apresentados sob a forma de gráficos em barra (figuras 5C a 8 e 10 a 12) foram analisados por One – Way ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey. O nível de significância foi determinado em $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média do grupo \pm erro padrão da média (média \pm E.P.M.).

5 RESULTADOS

5.1 Participação do TRPA1 no processo de sensibilização do nociceptor primário induzido pela PGE₂.

5.1.1 O receptor TRPA1 medeia a hiperalgesia inflamatória induzida pela PGE₂.

O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1 por seu antagonista seletivo HC diminuiu significativamente a hiperalgesia induzida pela administração de PGE₂ na pata de ratos (Figura 5A). A co-administração de HC (1200 µg por pata) diminuiu significativamente a hiperalgesia três, mas não seis horas após a injeção de PGE₂. Enquanto a administração de HC duas horas e cinquenta e cinco minutos depois da PGE₂ diminuiu significativamente a hiperalgesia três e seis horas após a injeção de PGE₂, conforme demonstrado pelo símbolo * (Figura 5A, *Two Way Repeated Measure ANOVA* e teste de Tukey, $p < 0.05$). Ao contrário da co-administração de 1200 µg de HC ($12,85 \pm 1,62$ g), a co-administração de 300 µg ($30,36 \pm 2,5$ g) não reduziu significativamente a hiperalgesia induzida pela PGE₂ ($36,36 \pm 0,82$ g), conforme pode ser observado pela comparação do efeito de cada tratamento três horas após as injeções, no pico da resposta hiperalgésica induzida pela PGE₂ (*One Way Anova* e teste de Tukey, $p < 0.05$, dados não plotados em gráfico). A administração de 1200 µg de HC na pata contralateral àquela que recebeu PGE₂ não afetou a resposta hiperalgésica quando o HC foi administrado no mesmo momento ($37,46 \pm 2,48$ g) ou duas horas e cinquenta e cinco minutos depois ($36,78 \pm 1,99$ g) da PGE₂, o que demonstra que seu efeito de bloqueio sobre receptores TRPA1 é restrito ao local de administração (*One Way Anova* e teste de Tukey, $p < 0.05$, dados não mostrados em gráfico).

O tratamento Intratecal com ODN-antisense (5 nmol por dia, durante quatro dias) contra o receptor TRPA1 preveniu a hiperalgesia induzida pela PGE₂, conforme demonstrado pelo símbolo + (Figura 5A, *Two Way Repeated Measure ANOVA* e teste de Tukey, $p < 0.05$) e diminui significativamente a expressão desse receptor em células do gânglio da raiz dorsal (L5-L6), conforme demonstrado pelo símbolo * (Figura 5B, teste t, $p < 0.05$). O tratamento Intratecal com mismatch ($33,20 \pm 1,03$ g, 5nmol por dia, durante quatro dias) não afetou a hiperalgesia induzida pela PGE₂ ($36,36 \pm 0,82$ g), conforme pode ser observado pela comparação do efeito de cada tratamento três horas após a injeção de PGE₂, no pico da resposta hiperalgésica (teste t, $p < 0.05$, dados não mostrados em gráfico).

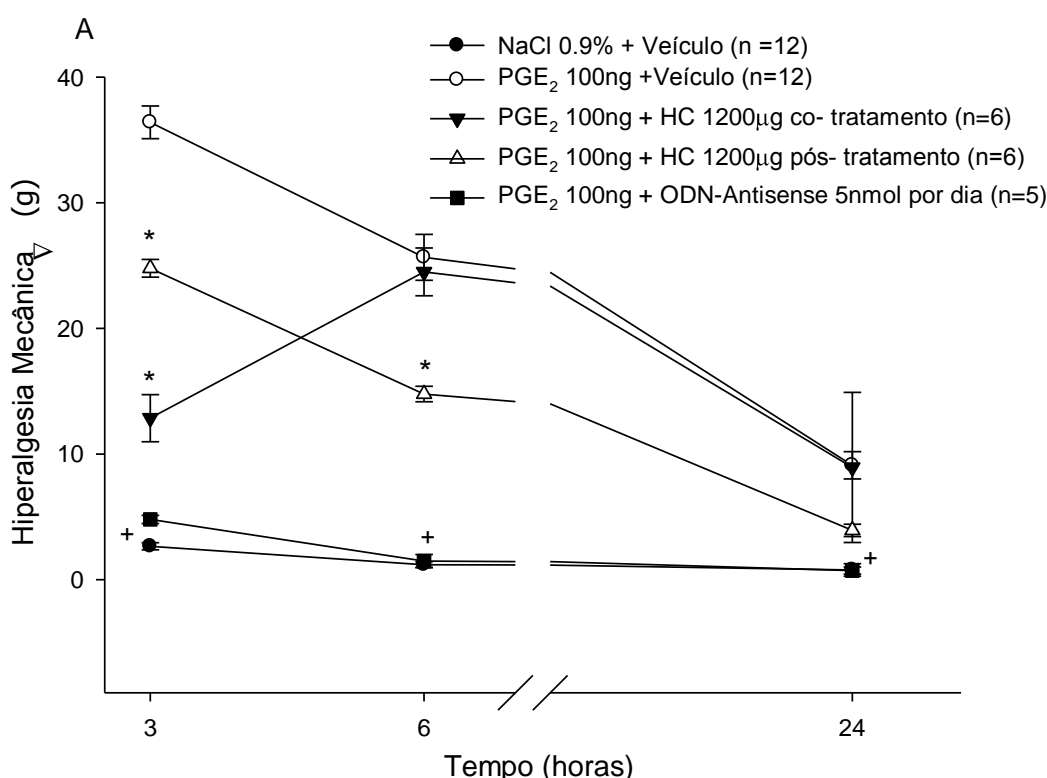


Figura 5A: Participação do receptor TRPA1 na hiperalgesia induzida pela PGE₂. O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1, pela administração de seu antagonista HC diminuiu significativamente e a diminuição da expressão neuronal de TRPA1 através da administração de ODN-antisense bloqueou a hiperalgesia inflamatória induzida pela PGE₂. O símbolo * indica hiperalgesia significativamente menor que aquela induzida pela PGE₂. O símbolo + indica hiperalgesia significativamente menor que aquela induzida pelo tratamento dos outros grupos. Existe interação estatisticamente significativa entre tempo e tratamento, *Two Way repeated ANOVA* e teste de Tukey ($P = < 0,001$; $f = 16,102$). O antagonista de receptores TRPA1, HC foi co-administrado ou administrado duas horas e cinquenta e cinco minutos depois da PGE₂ (pós-tratamento). Nessa e nas demais figuras a palavra veículo corresponde a dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado para dissolver o HC030031.

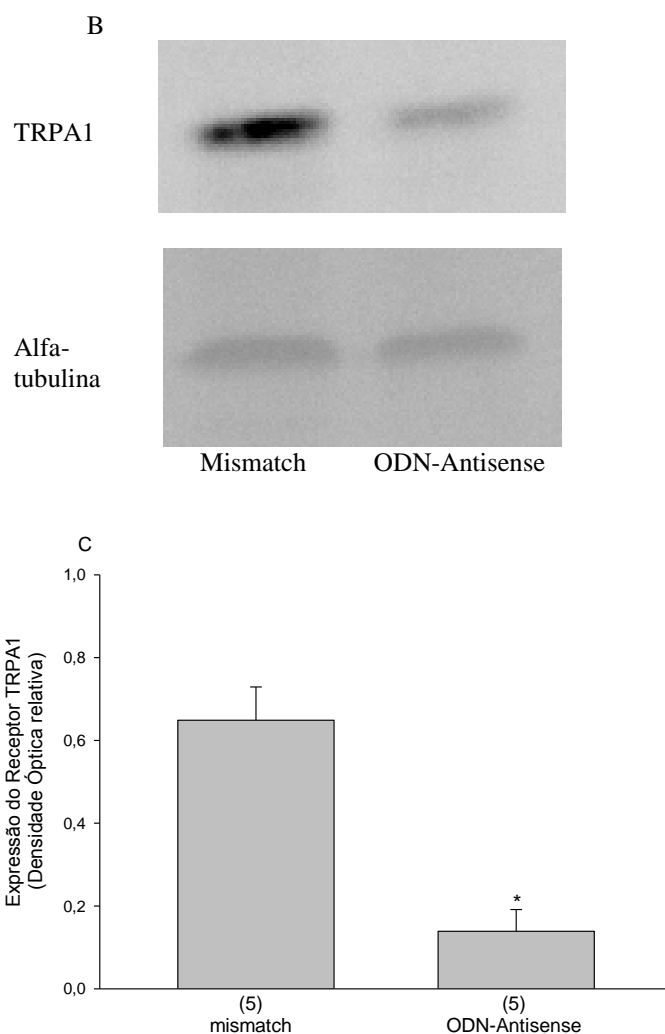


Figura 5B e C: Expressão de TRPA1 no gânglio da raiz dorsal L5 e 6 em animais tratados com mismatch ou ODN - antisense contra TRPA1 (administração Intratecal, 5 nmol por dia durante 4 dias).

B- Representação da densidade óptica da imunoreatividade do TRPA1.

C- Análise comparativa da densidade óptica (média \pm EPM, 5 animais por grupo, indicados pelo número entre parêntesis). O símbolo * indica diferença significativa entre os grupos (Teste t, $p < 0,05$). Esses dados foram coletados na Universidade Estadual de Campinas por meio de uma colaboração entre laboratórios.

5.1.2 O receptor TRPA1 não contribui para o limiar nociceptivo mecânico basal.

O bloqueio farmacológico do TRPA1, pela administração de seu antagonista HC ou a diminuição de sua expressão em células do gânglio da raiz dorsal (L5 e 6), através da administração de ODN-antisense, não afetou o limiar nociceptivo avaliado após a administração intraplantar de NaCl 0,9% (Figura 6, *One Way ANOVA*, $p > 0,05$).

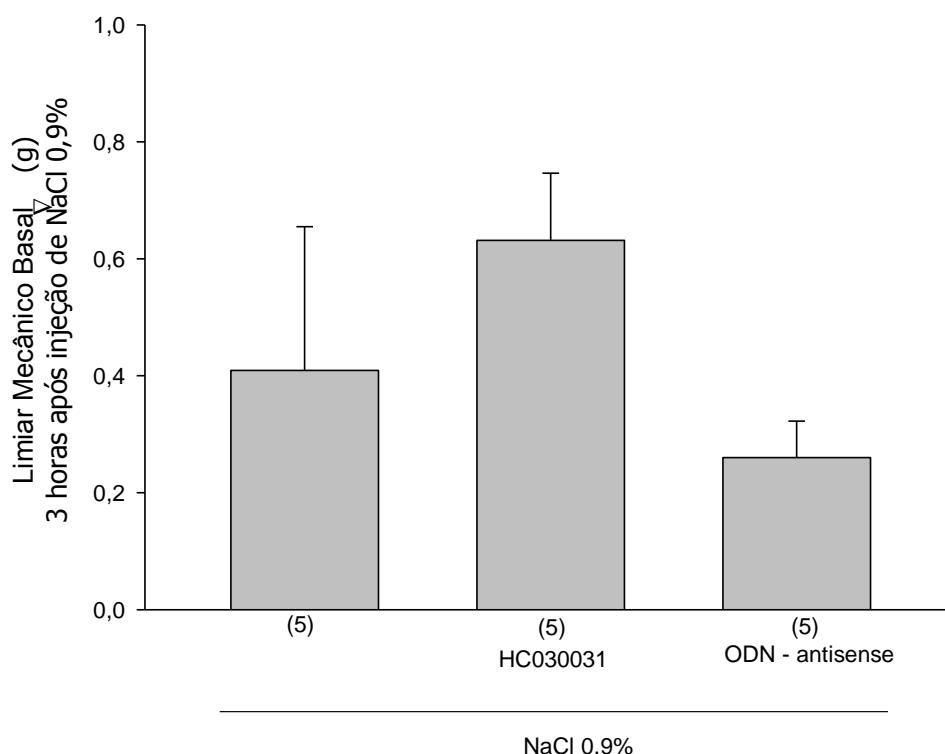


Figura 6: O receptor TRPA1 não contribui para o limiar nociceptivo basal. O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1, pela administração de seu antagonista HC (1200µg por pata) ou a diminuição da expressão neuronal de TRPA1 através da administração de antisense (administração intratecal, 5 nmol por dia, durante 4 dias) não afetou o limiar nociceptivo mecânico avaliado após administração de NaCl 0,9%, *One Way ANOVA* e teste de Tukey, $p > 0,05$. Números entre parêntesis correspondem ao número de animais em cada grupo.

5.1.3 A participação do TRPA1 na sensibilização inflamatória induzida pela PGE₂ também pode ser demonstrada através de estimulação química.

Alguns trabalhos demonstraram que o TRPA1 pode ser ativado por estímulos mecânicos e, no presente estudo, utilizamos um teste comportamental no qual um estímulo mecânico é utilizado para avaliar a hiperalgesia inflamatória. Portanto, para excluir a possibilidade de que o TRPA1 mediasse apenas a sensibilização inflamatória evidenciada por estimulação mecânica, utilizamos também um estímulo químico. Para isso utilizamos capsaicina, uma vez que ela é capaz de ativar diretamente fibras nociceptivas C, por ser agonista seletivo de receptores TRPV1, produzindo um evidente comportamento nociceptivo que não é

afetado pelo bloqueio do receptor TRPA1. A nocicepção induzida pela administração de uma baixa dose (0,5 μ g) de capsaicina na pata foi significativamente aumentada pela administração prévia (3 horas antes) de PGE₂. O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1, através da administração de seu antagonista, reverteu completamente a sensibilização induzida pela PGE₂, enquanto não afetou a nocicepção induzida pela capsaicina por si só (Figura 7, *One Way ANOVA* e teste de Tukey, $p < 0.05$). Esses dados demonstram que a sensibilização induzida pela PGE₂, e nesse caso, avaliada através de um estímulo químico, depende do receptor TRPA1.

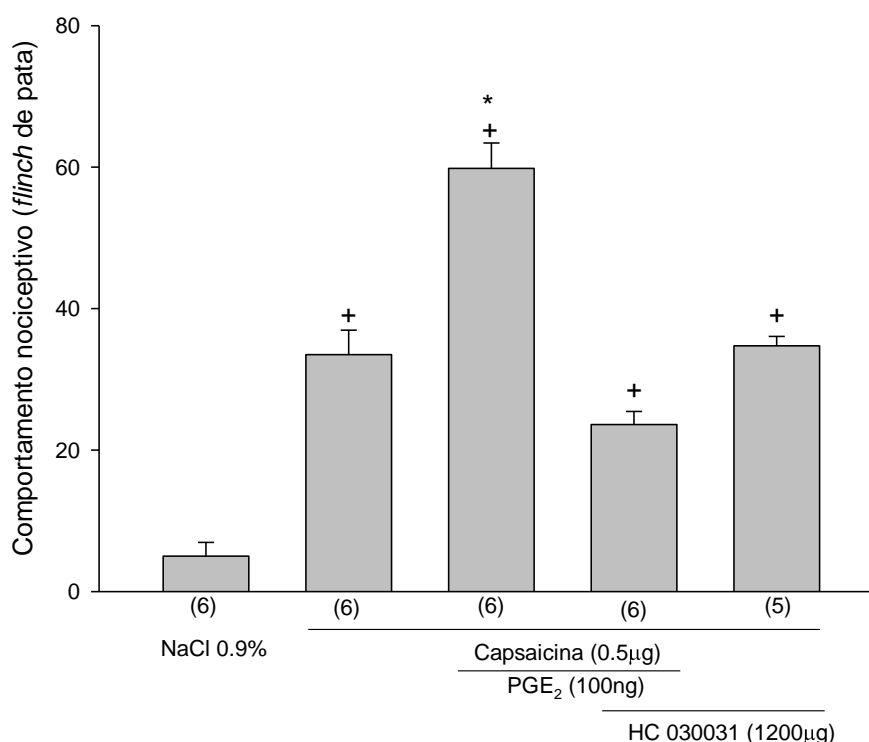


Figura 7: O TRPA1 medeia a sensibilização induzida pela PGE₂ evidenciada por estímulo químico. A nocicepção induzida pela capsaicina (avaliada durante 15 minutos) foi significativamente aumentada pela administração prévia (3 horas antes) de PGE₂, como indicado pelo símbolo *. O bloqueio farmacológico do TRPA1 reverteu o efeito de sensibilização da PGE₂ enquanto não afetou a nocicepção induzida pela capsaicina. O símbolo + indica resposta significativamente maior que aquela induzida pela administração de NaCl 0,9%. *One Way ANOVA* e teste de Tukey test, $p < 0,05$. Números entre parêntesis correspondem ao número de animais em cada grupo.

5.1.4 A PGE_2 não modula a expressão de TRPA1 em células do gânglio da raiz dorsal.

A administração intraplantar de PGE_2 não aumentou significativamente a expressão do TRPA1 em células do gânglio da raiz dorsal (L5 e 6), relativas ao campo receptivo periférico onde a PGE_2 foi administrada. A quantificação da expressão protéica foi realizada 3 e 24 horas após a administração de PGE_2 (Figura 8, *One Way Anova*, $p = 0.075$).

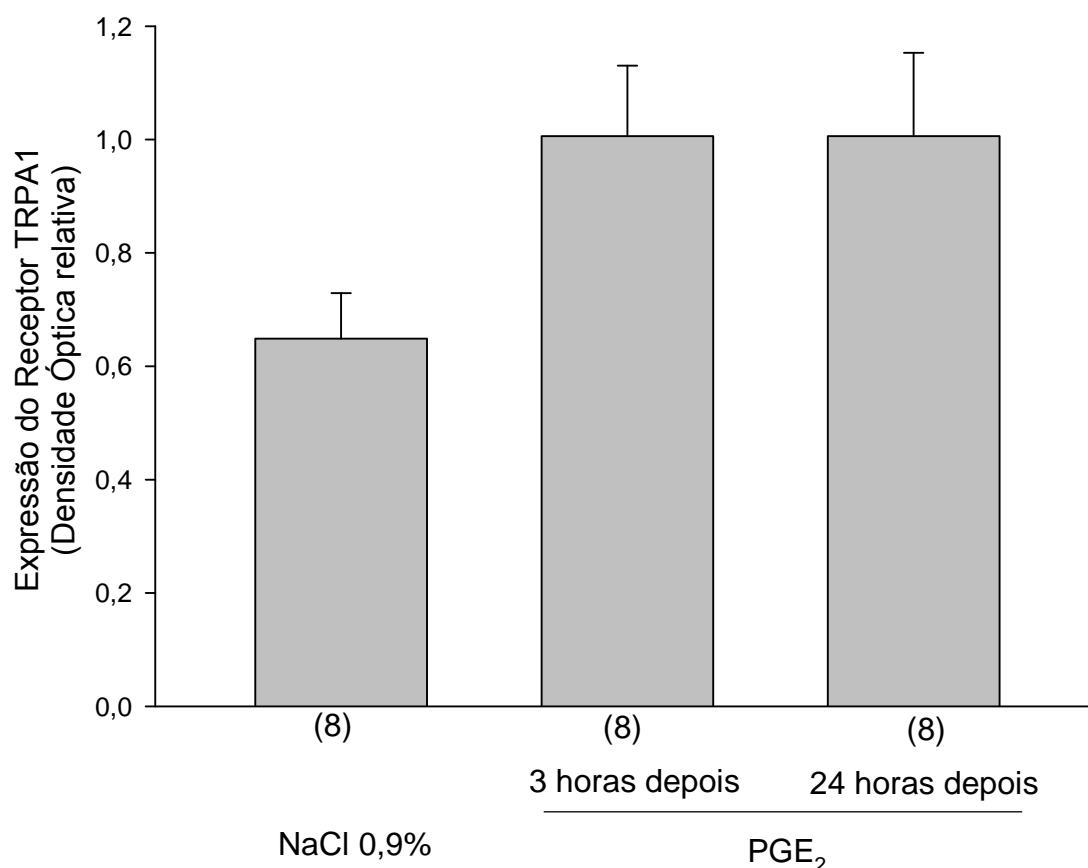


Figura 8: Expressão de TRPA1 no gânglio da raiz dorsal L5 e L6 de animais tratados com PGE_2 ou veículo. Análise comparativa da densidade óptica (média \pm EPM, 8 animais por grupo, indicados pelo número entre parêntesis) *One Way Anova* $p = 0,075$. Esses dados foram coletados na Universidade Estadual de Campinas por meio de uma colaboração entre laboratórios.

5.2 Mecanismo de ativação do TRPA1 na hiperalgesia inflamatória induzida por PGE₂

Para identificar o mecanismo envolvido na participação do receptor TRPA1 no processo de sensibilização induzido pela PGE₂ utilizamos os mediadores que atuam nos diferentes estágios dos eventos intracelulares induzida pela PGE₂ e verificamos o efeito do bloqueio do TRPA1 na resposta hiperalgésica de cada um deles. Inicialmente, comparamos a resposta hiperalgésica induzida pela PGE₂ com aquela induzida pelo AMPc, pela pKAcs e pelo ativador da pKCε. O pico da hiperalgesia induzida por cada um desses mediadores exógenos ocorreu três horas após a injeção, e nesse tempo foi semelhante àquela induzida pela PGE₂ (Figura 9, *Two Way Repeated Measure ANOVA* e teste de Tukey, $p < 0.05$). Portanto, a habilidade do antagonista de receptores TRPA1 ou do antisense contra TRPA1 em bloquear a hiperalgesia induzida por cada um desses mediadores foi avaliada três horas após a injeção. As doses de AMPc e pKCε utilizadas estão baseadas em dados da literatura (SACHS et al., 2009), a dose de pKA previamente descrita na literatura (9U: $21,29 \pm 0,85$ g, SACHS et al., 2009) foi aumentada (24U: $34,86 \pm 1,76$ g) com o objetivo de obter resposta hiperalgésica semelhante aquela induzida pela PGE₂ ($36,36 \pm 0,82$ g), conforme pode ser observado pela comparação do efeito de cada tratamento três horas após as injeções (*One Way Anova* e teste de Tukey, $p < 0.05$, dados não mostrados em gráfico).

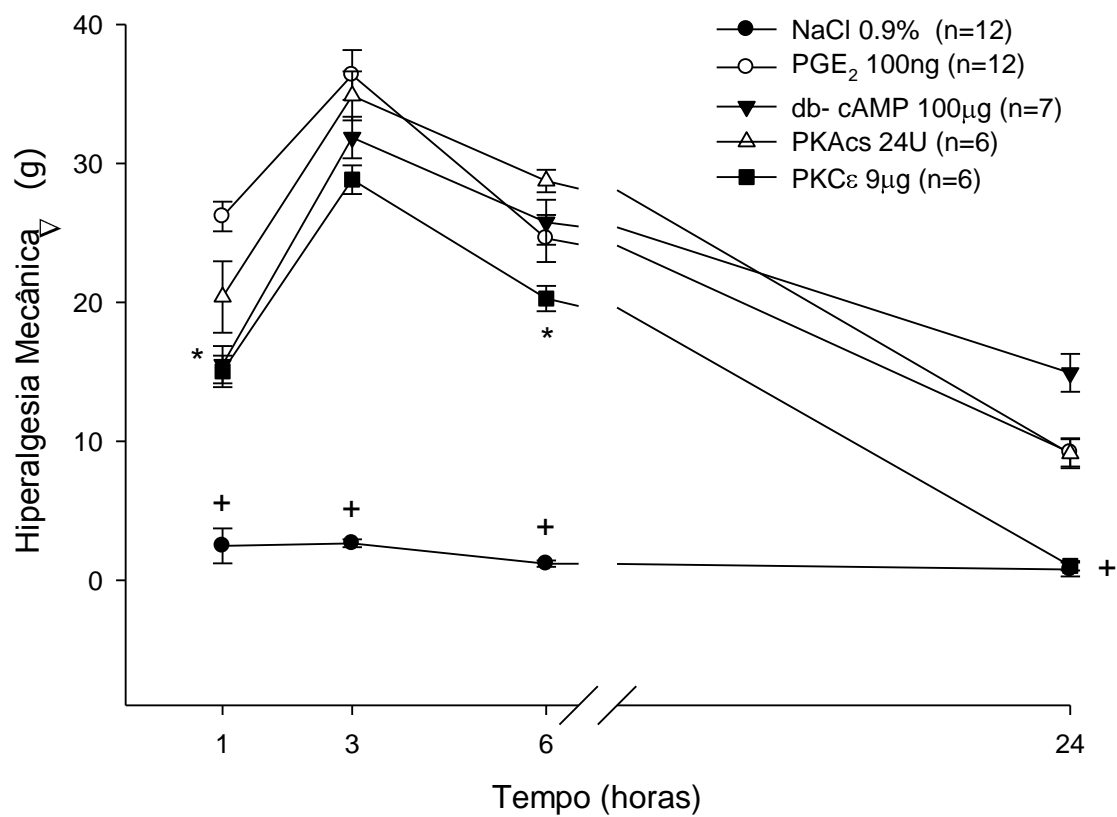


Figura 9: Comparação do efeito hiperálgico induzido pela PGE₂ e seus mediadores. O AMPc, a subunidade catalítica da pKA e o ativador da pKCε induzem hiperálgia semelhante aquela induzida pela PGE₂ e com pico três horas após a injeção. O símbolo * indica resposta menor que aquela da PGE₂ e o símbolo + indica resposta menor que aquela dos outros grupos. Existe interação estatisticamente significativa entre tempo e tratamento, *Two Way repeated ANOVA* e teste de Tukey $p < 0.05$.

5.2.1 O receptor TRPA1 medeia a hiperalgesia induzida pelo AMPc

O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1, através da administração local de seu antagonista HC (1200 μ g) diminuiu significativamente a hiperalgesia induzida pelo AMPc, conforme demonstrado pelo símbolo * (Figura 10, teste de Tukey, $p < 0.05$).

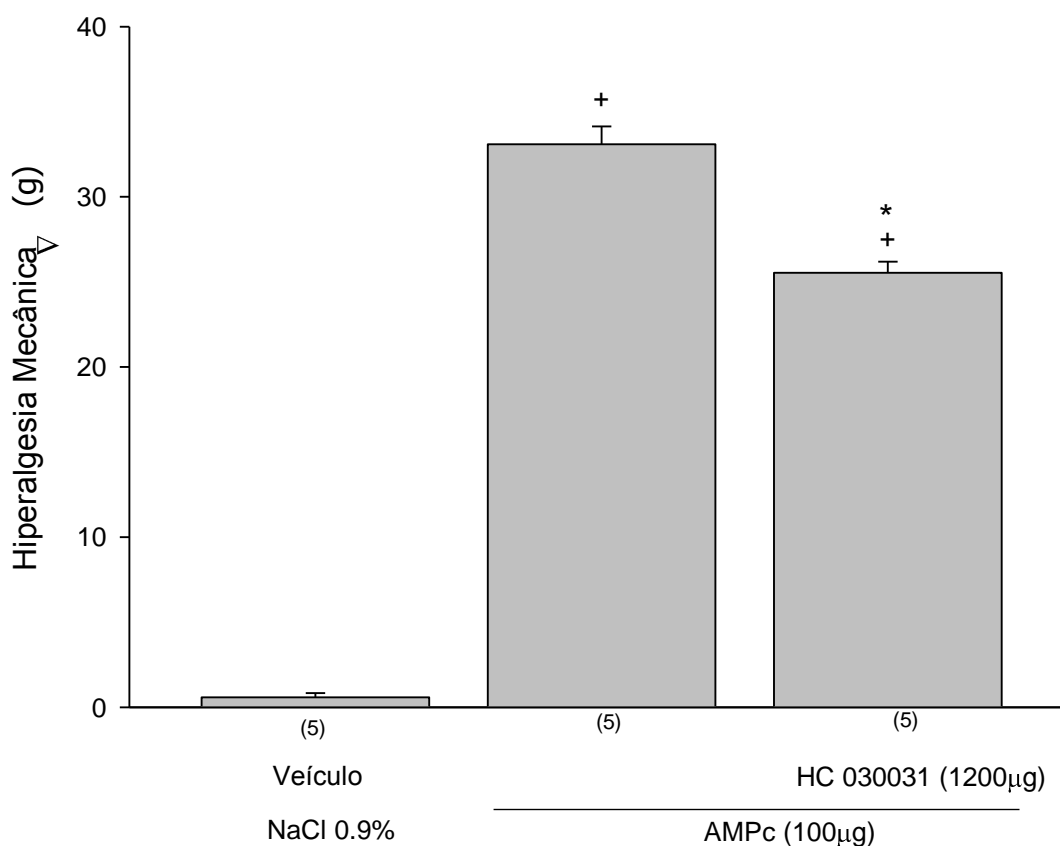


Figura 10: Papel do receptor TRPA1 na hiperalgesia induzida pelo AMPc. O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1, pela administração de seu antagonista HC diminuiu significativamente a hiperalgesia inflamatória induzida pelo AMPc, conforme indicado pelo símbolo *. O símbolo + indica resposta maior que aquela induzida pela administração de NaCl 0,9%, Teste de Tukey, $p < 0,05$. Medidas realizadas no tempo de 3 horas. Números entre parêntesis indicam o número de animais em cada grupo.

5.2.2 O receptor TRPA1 medeia a hiperalgesia induzida pela subunidade catalítica da pKA.

O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1, através da administração local de seu antagonista ou a diminuição da expressão de TRPA1 nas células do gânglio da raiz dorsal, através da administração de antisense, diminuiu significativamente a hiperalgesia induzida pela pKA, conforme demonstrado pelo símbolo * (Figura 11, teste de Tukey, $p < 0.05$).

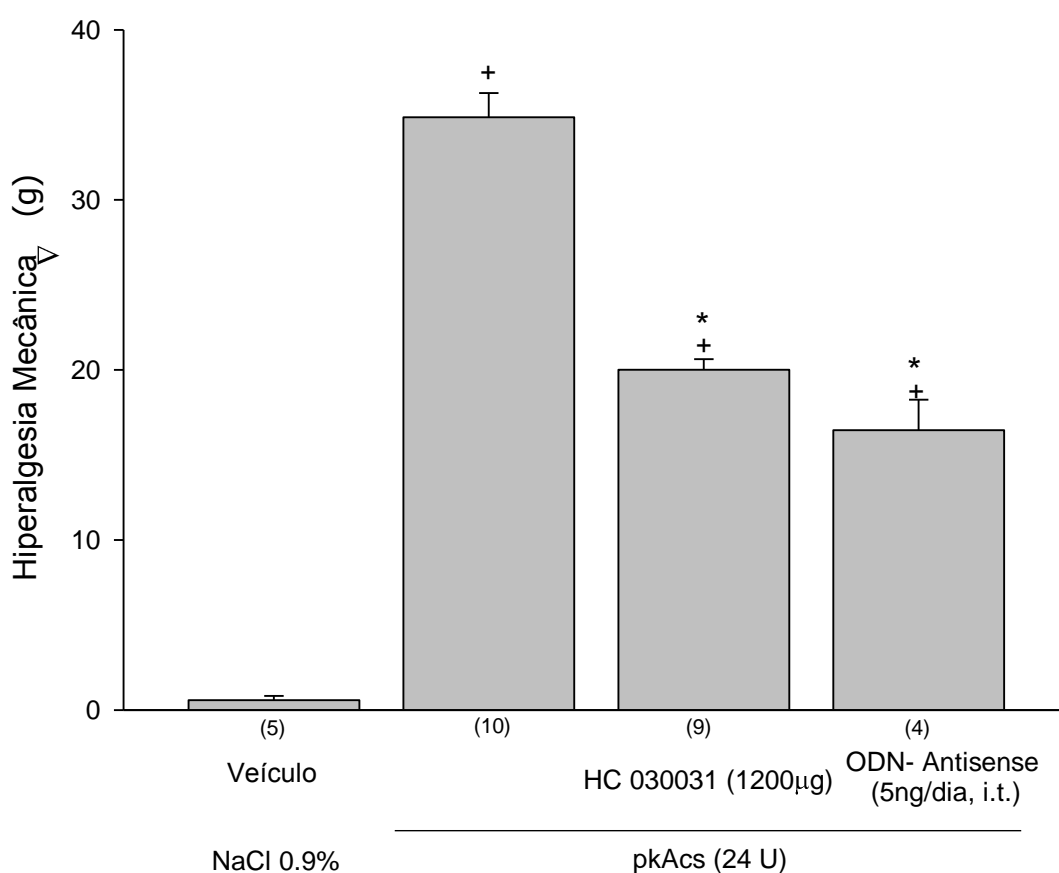


Figura 11: Papel do receptor TRPA1 na hiperalgesia induzida pela pKAcs. O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1, pela administração de seu antagonista HC, ou a diminuição da expressão neuronal de TRPA1 através da administração de ODN-antisense diminuiu significativamente a hiperalgesia inflamatória induzida pela pKAcs, conforme indicado pelo símbolo *. O símbolo + indica resposta maior que aquela induzida pela administração de NaCl 0,9%, Teste de Tukey, $p < 0,05$.

5.2.3 O receptor TRPA1 medeia a hiperalgesia induzida pela isoforma épsilon da pKC.

O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1, através da administração local de seu antagonista ou a diminuição da expressão do TRPA1 nas células do gânglio da raiz dorsal, através da administração de ODN-antisense diminuiu significativamente a hiperalgesia induzida pela pKC ϵ , conforme demonstrado pelo símbolo * (Figura 12, teste de Tukey, $p < 0.05$).

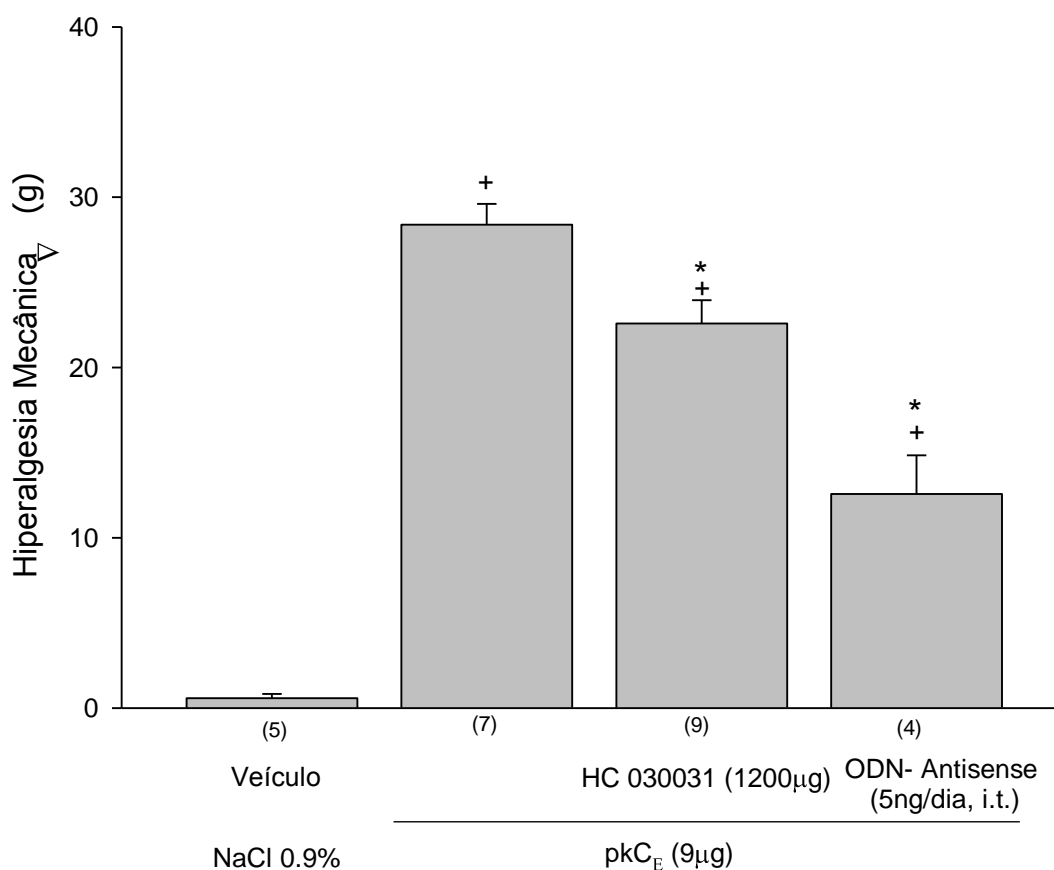


Figura 12: Papel do receptor TRPA1 na hiperalgesia induzida pela pKC ϵ . O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1, pela administração de seu antagonista HC, ou a diminuição da expressão neuronal de TRPA1 através da administração de antisense diminuiu significativamente a hiperalgesia inflamatória induzida pela pKC ϵ , conforme indicado pelo símbolo *. O símbolo + indica resposta maior que aquela induzida pela administração de NaCl 0,9%, Teste de Tukey, $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que a ativação do receptor TRPA1 em neurônios nociceptivos primários é essencial para a sensibilização inflamatória induzida pela PGE₂. Essa idéia é suportada pelos dados experimentais que demonstram que a hiperalgesia inflamatória induzida pela PGE₂ não se desenvolve quando a expressão do receptor TRPA1 em células do gânglio da raiz dorsal é significativamente diminuída pela administração intratecal de ODN-antisense contra TRPA1. O TRPA1 também medeia a hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de AMPc, pKA e pKCε, que são os mediadores intracelulares responsáveis pelos efeitos sensibilizantes da PGE₂. Como o aumento do AMPc precede a ativação da pKA, que posteriormente se traduz na ativação da pKCε (SACHS et al., 2009), não se sabe se cada um desses mediadores ativa o TRPA1 paralelamente ou se a ativação do TRPA1 é mediada exclusivamente pela isoforma épsilon da pKC.

As PGs podem ser consideradas os principais mediadores da dor inflamatória, tanto que o bloqueio de sua síntese enzimática é até hoje a primeira opção para o tratamento e controle da maioria das condições dolorosas. O fato do bloqueio da função de um único receptor neuronal impedir o desenvolvimento da sensibilização inflamatória induzida pela PGE₂, como demonstrado pela primeira vez nesse estudo, é de grande relevância científica e possivelmente terapêutica, uma vez que abre a possibilidade para o desenvolvimento de fármacos que controlem a dor inflamatória ao bloquear o receptor TRPA1 e assim inibir a sensibilização inflamatória induzida pelas PGs. Evidentemente, há um longo caminho a ser percorrido e muitos estudos ainda são necessários para avaliar o potencial terapêutico de fármacos que bloqueiem o receptor TRPA1. No entanto, em uma primeira análise as vantagens

desses fármacos sobre os tradicionais AINEs são evidentes. Primeiramente por que seu uso não estaria associado aos efeitos colaterais gastrointestinais, uma vez que a síntese de PGs protetoras da mucosa gástrica estaria preservada. Segundo, por que a possibilidade de qualquer efeito colateral de um fármaco que atue sobre o receptor TRPA1 é muito reduzida, uma vez que ele é expresso predominantemente em neurônios nociceptivos primários (STORY et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2005; NAGATA et al., 2005). Por fim, o mecanismo de ação de um fármaco que bloqueie o receptor TRPA1 não se restringiria a inibição da ação algésica de mediadores formados pela ciclooxygenase. Isso é clinicamente relevante por que o TRPA1 pode ser ativado por múltiplos mecanismos associados a inflamação, por exemplo, já foi demonstrado que a hiperalgesia induzida pela BK depende da ativação do receptor TRPA1 em resposta a ativação do receptor B₂ de BK (BANDELL et al. 2004; BAUTISTA et al. 2006; PETRUS, et al., 2007; WANG et al. 2008). Além disso, sabe-se que metabólitos eletrofílicos de PGs e agentes oxidantes como o HNE, peróxido de hidrogênio e hipoclorito, todos produzidos em quantidades consideráveis durante o processo inflamatório, induzem nocicepção ao ativar diretamente o TRPA1 devido a modificações covalentes induzidas pela reação com resíduos de cisteína (MACPHERSON et al. 2007a; TREVISANI et al. 2007; CRUZ-ORENGO et al. 2008; TAYLOR-CLARK et al. 2008). Juntas, essas evidências sugerem que o TRPA1 é um excelente alvo em potencial para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento e controle da dor inflamatória.

Embora a participação do TRPA1 nos mecanismos nociceptivos inflamatórios tenha sido amplamente demonstrada (BANDELL et al., 2004; JORDT, et al., 2004; OBATA et al. 2005; HINMAM et al., 2006; BAUTISTA et al., 2006; KWAN et al. 2006; DAI et al., 2007; MACPHERSON et al., 2007; TREVISANI et al., 2007; MCNAMARA

et al., 2007; TAYLOR-CLARK et al., 2007; PETRUS et al. 2007; EID et al. 2008; DUNHAM et al. 2008; MATERAZZI et al., 2008; WANG et al., 2008; CRUZ-ORENGO et al. 2008; SCHIMIDT, et al., 2009; DA COSTA et al. 2010), esse estudo amplia significativamente o entendimento sobre a função desse receptor na dor inflamatória, pois demonstra que a função desse canal de cátions neuronal é necessária para a manutenção do estado de sensibilização comum a todas as dores inflamatórias. Os dados que suportam essa idéia foram obtidos através do bloqueio farmacológico do receptor TRPA1 em dois momentos diferentes do curso da hiperalgesia induzida pela PGE₂. A co-administração do antagonista seletivo de receptores TRPA1 (HC) com PGE₂ diminuiu a hiperalgesia três, mas não seis horas após a injeção de PGE₂. Esse dado, aliado ao fato de que estudos anteriores demonstram que a duração do efeito do HC não é superior a seis horas (DA COSTA et al. 2010), indica que o HC diminui a hiperalgesia induzida pela PGE₂ enquanto seu efeito de bloqueio sobre os receptores TRPA1 estiver presente. Essa idéia é suportada pelo efeito do HC quando administrado duas horas e cinquenta e cinco minutos depois da PGE₂, pois mesmo sendo administrado apenas cinco minutos antes da mensuração da resposta, o HC diminuiu significativamente a hiperalgesia. Talvez esse seja o dado mais surpreendente de nosso estudo, pois demonstra claramente que a função do receptor TRPA1 é necessária para a sensibilização inflamatória induzida por PGE₂. Esse dado sugere que as mudanças bioquímicas que ocorrem no neurônio nociceptivo primário, durante o processo de sensibilização *in vivo*, mantém o receptor TRPA1 em constante estado funcional. Isso não é suficiente para ativar a fibra nociceptiva, pois não há nocicepção espontânea, mas parece ser essencial para a leve despolarização da fibra nociceptiva que caracteriza o processo de sensibilização ao aproximar o potencial de membrana do limiar nociceptivo.

Portanto, ao bloquearmos o TRPA1, mesmo depois de instalada a hiperalgesia, interferimos de forma bastante significativa com todo o processo de sensibilização. Esse papel essencial do TRPA1 na manutenção do estado de hiperalgesia inflamatória explica por que ao se induzir a diminuição da expressão do TRPA1 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal, pela administração de antisense, a hiperalgesia não se desenvolve.

Já foi demonstrado que as PGs das séries A e J (PGA₂, PGA₁ e PGJ₂), que são metabólitos formados a partir da PGE₂, PGE₁ e PGD₂, respectivamente, ativam diretamente o TRPA1 por ligações covalentes inespecíficas (CRUZ-ORENGO et al. 2008; TAYLOR-CLARK et al. 2008). A ação biológica desses metabólitos eletrofílicos de PGs não é mediada pela ativação clássica de um receptor EP acoplado a proteína G, mas sim através de interação direta com proteínas alvo. Por possuírem um grupo eletrofílico carbonila (*carbonyl*) α,β - insaturado, capaz de realizar reações de adição de Michael (STRAUS, 2001), ativam o TRPA1, mas não o TRPV1 e o TRPM8 (CRUZ-ORENGO et al. 2008; TAYLOR-CLARK et al. 2008). Conhece-se muito pouco sobre o papel desses metabólitos nos mecanismos nociceptivos, são produzidos em quantidades muito pequenas *in vivo*, tendo sido descritos previamente na literatura principalmente relacionados a uma ação antiinflamatória (SCHER; PILLINGER, 2005). Ao contrário, a PGE₂, cuja concentração é elevada nos processos inflamatórios (DAVIES et al., 1984; WOOLF; COSTIGAN, 1999), é a principal responsável pelos efeitos hiperalgésicos atribuídos as PGs *in vivo* (FERREIRA; NAKAMURA, 1979). A ação de sensibilização da PGE₂ no neurônio primário depende da ativação de seus receptores EP (NARUMIYA, SUGIMOTO, USHIKUBI, 1991; NARUMIYA, FITZGERALD, 2001; BREYER et al., 2001) e subseqüentemente, da via da AC - AMPc (FERREIRA; NAKAMURA, 1979). Além

disso, a PGE₂ não possui o grupo eletrofílico capaz de realizar ativação direta do TRPA1 (TAYLOR-CLARK et al., 2008), o que evidencia que o mecanismo pelo qual a PGE₂ ativa o TRPA1 para induzir hiperalgesia não é mediado por sua interação direta com o receptor TRPA1.

Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro a demonstrar que a PGE₂ ativa o TRPA1 *in vivo* e que isso é essencial para sua ação de sensibilização inflamatória. No entanto, um estudo recente, que utilizou uma dose de PGE₂ capaz de induzir nocicepção, demonstrou que a resposta nociceptiva induzida pela PGE₂ não era alterada pela deleção do gene do TRPA1 em camundongos (MATERAZZI et al., 2008). A aparente divergência entre esses e os nossos resultados, pode ser facilmente explicada pela diferença nos mecanismos estudados e na metodologia utilizada. Em primeiro lugar, nós avaliamos a hiperalgesia inflamatória induzida pela PGE₂, enquanto Materazzi et al. (2008) avaliaram a nocicepção. Os mecanismos que medeiam a hiperalgesia e a nocicepção induzidas por um mesmo mediador são diferentes (OLIVEIRA et al., 2007). Além disso, a quantidade de PGE₂ liberada endogenamente, no sítio da inflamação, induz sensibilização (experimentalmente avaliada *in vivo* pela hiperalgesia) e não ativação (experimentalmente avaliada pela nocicepção espontânea) dos neurônios nociceptivos. Portanto, a utilização de uma dose nociceptiva de PGE₂ não é adequada para estudar os efeitos endógenos por ela mediados. Em segundo lugar, um estudo recente apontou que a metodologia de deleção do gene do TRPA1 pode não ser adequada para estudar sua participação nos mecanismos nociceptivos. Enquanto o bloqueio farmacológico do TRPA1 em animais selvagens reduz drasticamente a hiperalgesia induzida por CFA, animais deficientes para o TRPA1 a desenvolvem normalmente, o que evidencia o desenvolvimento de mecanismos de adaptação em resposta a deleção do gene do

TRPA1 (PETRUS et al., 2007). Além desses dados *in vivo*, dados *in vitro* obtidos a partir da quantificação de correntes iônicas em células de expressão heteróloga, ou neurônios primários, falharam em demonstrar a ativação do TRPA1 pela PGE₂ (TAYLOR-CLARK et al., 2008; MATERAZZI et al., 2008). Esses resultados negativos possivelmente se devem a dificuldade metodológica de se observar correntes iônicas induzidas pela PGE₂. Apesar dessa dificuldade, conseguimos demonstrar (dados não mostrados, em fase de análise), por imunofluorescência, que a PGE₂ induz influxo de Ca⁺⁺ em células do gânglio da raiz dorsal mantidas em cultura e dados preliminares deste estudo sugerem a participação do TRPA1 nesse influxo.

Embora a ativação do TRPA1 por diversos compostos químicos e mediadores inflamatórios seja inquestionável, sua participação na transdução de estímulos mecânicos permanece duvidosa, devido a uma série de resultados contraditórios. Está bem estabelecido que, apesar de expresso em células ciliadas do ouvido, o TRPA1 não contribui para a transdução do estímulo mecânico responsável pela audição (BAUTISTA et al. 2006; KWAN et al. 2006; PROBER et al. 2008). No entanto, sua participação na transdução do estímulo mecânico em células do gânglio da raiz dorsal é questionável, com diversos resultados apontando a favor (KWAN et al. 2006, 2009; BRIERLEY et al. 2009; KERSTEIN et al. 2009; VILCEANU; STUCKY, 2010) e contra (BAUTISTA et al. 2006; BHATTACHARYA et al. 2008; KWAN et al. 2009; RUGIERO; WOOD, 2009) a participação do TRPA1 nesse processo. Nossos dados demonstram claramente que o bloqueio farmacológico do receptor TRPA1, pela administração de seu antagonista ou a diminuição da expressão neuronal de TRPA1 através da administração de antisense não afeta o limiar nociceptivo mecânico avaliado após administração de NaCl 0,9% (Figura 6). Esse dado sugere que o receptor TRPA1 não contribui para o limiar mecânico basal, ou seja, em

condições normais, na ausência de lesão tecidual e reação inflamatória, o TRPA1 não é ativado por estímulos mecânicos. No entanto, ainda era necessário excluir a possibilidade de que a PGE_2 sensibilizasse o TRPA1 somente à estimulação mecânica. Portanto, para excluir o efeito inibitório do antagonista de receptor TRPA1 sobre o estímulo mecânico, utilizamos também um estímulo químico (capsaicina) para evidenciar a sensibilização do TRPA1 mediada pela PGE_2 . O antagonista de receptor TRPA1 bloqueou a sensibilização induzida pela PGE_2 e experimentalmente avaliada pelo aumento da resposta nociceptiva induzida pela capsaicina, sem afetar essa resposta por si só. Esses dados demonstram que a sensibilização induzida pela PGE_2 , e nesse caso, avaliada através de um estímulo químico, é dependente do receptor TRPA1. Portanto, nos permitem concluir que independentemente da participação do receptor TRPA1 na transdução do estímulo mecânico, este receptor definitivamente está envolvido na sensibilização inflamatória dos neurônios nociceptivos primários.

Vários estudos demonstraram que a expressão do TRPA1 em neurônios nociceptivos é modulada durante o processo inflamatório (OBATA et al., 2005; DIOGENES et al., 2007; FREDERICK et al., 2007; DUNHAM et al., 2008; DA COSTA et al., 2009). No entanto, nossos dados, obtidos pela técnica de Western Blot, sugerem que a PGE_2 não afeta a expressão do receptor TRPA1 (Figura 8) em células do gânglio da raiz dorsal (L 5 e 6). Esse dado contrasta com alguns estudos que demonstram que a expressão do TRPA1 aumenta após a neuropatia (OBATA et al., 2005; FREDERICK et al., 2007) e a inflamação induzida por NGF ou CFA (OBATA et al., 2005; DUNHAM et al., 2008; DA COSTA et al., 2009; DIOGENES et al., 2007). Essa aparente discrepância pode ser melhor compreendida se analisarmos algumas diferenças metodológicas entre esses e o nosso estudo.

Primeiramente, é importante salientar que o NGF está classicamente associado ao controle da expressão de vários genes associados a inflamação e a nocicepção (BOWLES et al., 2004; PRICE et al., 2005; SKOFF; ADLER, 2006). Portanto, não é surpresa que o gene do TRPA1 esteja entre os genes por ele controlados. Com relação ao CFA, é importante considerarmos que ele está amplamente associado a ativação de diversas vias de sinalização classicamente envolvidas nos mecanismos nociceptivos inflamatórios (BOWLES et al., 2004; PRICE et al., 2005; SKOFF; ADLER, 2006; DIOGENES et al., 2007), entre elas, o aumento nos níveis de NGF (SEBERT, SHOOTER, 1993; WHEELER et al., 1998; SULLINS et al., 2000). Portanto, ao contrário da PGE_2 que atua sobre receptores específicos, levando a ativação de vias bioquímicas determinadas, o CFA induz a ampla ativação de diversos mecanismos inflamatórios, o que poderia explicar por que ele, mas não a PGE_2 aumenta a expressão do TRPA1 em células do gânglio da raiz dorsal. Por fim, em ambos os modelos de neuropatia e de inflamação induzida por CFA as alterações bioquímicas observadas nos neurônios nociceptivos primários se dão a médio e longo prazo. De fato, a alteração na expressão do TRPA1 nesses estudos foi observada entre 48 horas até 7 dias após o estímulo (DA COSTA et al., 2009, OBATA et al., 2005; DUNHAM et al., 2008, DIOGENES et al., 2007; FREDERICK et al., 2007). Ao contrário, o pico da sensibilização induzida pela PGE_2 ocorre três horas após sua administração. Embora esse período de tempo seja, comumente, suficiente para que se observe alteração na síntese protéica, é possível que a PGE_2 , dentro desse curto espaço de tempo, altere a expressão de receptores TRPA1 funcionais, sem alterar sua expressão gênica. Isso é possível por que o receptor TRPA1 é um receptor integral de membrana, ou seja, uma vez sintetizado ele é armazenado em vesículas de membranas no citoplasma celular (SCHMIDT et al.

2009). Portanto, assim como muitos receptores e canais iônicos, o TRPA1 cicla entre a membrana plasmática e o meio intracelular, e o balanço entre a inserção e a reentrada determina tanto a quantidade exposta na membrana, quanto a sua atividade funcional (MALENKA, 2003; SHEPHERD; HUGANIR, 2007; AMBUDKAR, 2007). Entre os estímulos capazes de induzir rápida translocação do TRPA1 para a membrana celular estão a ativação da PLC, da pKA e do próprio TRPA1 (SCHMIDT et al. 2009). Portanto, ao invés de aumentar a transcrição gênica do TRPA1, a PGE₂, através da ativação da via da pKA (PARADA et al., 2005), da PLC (MORIYAMA et al., 2005) e/ou do próprio TRPA1 poderia aumentar a translocação desse receptor da vesícula citoplasmática para a membrana celular, aumentando desta forma a quantidade de receptores funcionais, sem induzir necessariamente a síntese de novos receptores. Infelizmente a técnica de Western Blot não permite comprovar se esse é realmente o caso, pois nessa técnica se faz uma leitura da quantidade total de TRPA1 na célula, sem mensurar a movimentação funcional do TRPA1 entre o citoplasma e a membrana celular.

De acordo com a idéia de que o TRPA1 tem papel fundamental na sensibilização neuronal que resulta em hiperalgesia, já foi demonstrado que o TRPA1 medeia a hiperalgesia neuropática (OBATA et al. 2005; KWAN et al. 2006; FREDERICK et al., 2007; EID et al. 2008), diabética (KOIVISTO, 2011) e inflamatória, induzida por BK (BANDELL et al. 2004; BAUTISTA et al. 2006; PETRUS, et al., 2007; WANG et al. 2008), CFA (DA COSTA et al. 2010; OBATA et al. 2005; PETRUS et al. 2007; DUNHAM et al. 2008; EID et al. 2008), NGF (DIOGENES et al., 2007) e TNF- α (FERNANDES et al., 2011). Além disso, dados preliminares obtidos em nosso laboratório indicam que o TRPA1 também é essencial para a hiperalgesia induzida pela carragenina (CG). Uma vez que a CG induz

hiperalgesia ao ativar duas vias independentes, que resultam, em última instância, na liberação de aminas simpatomiméticas e na formação de PGs (FERREIRA, LORENZETTI, POOLE, 1993), esse dado, não só suporta a participação do TRPA1 na hiperalgesia induzida pela PGE_2 , mas também sugere que o TRPA1 possa mediar a hiperalgesia induzida pelas aminas simpatomiméticas. Esta hipótese será objeto de estudos futuros. De fato, o número de substâncias algogênicas capazes de ativar o receptor TRPA1 é tão grande (íons cálcio, substâncias reativas endógenas, mediadores inflamatórios) que é difícil imaginar um modelo de dor inflamatória e, portanto, uma condição dolorosa, que não responda adequadamente ao bloqueio desse receptor.

Múltiplas vias de sinalização convergem para regular a função do TRPA1, que pode ser ativado em resposta às alterações bioquímicas que se seguem a ativação de receptores de diversos mediadores inflamatórios (BANDELL et al., 2004; JORDT et al., 2004; DAI et al., 2007). A sensibilização do nociceptor primário induzida pela PGE_2 é dependente da ativação dos receptores de prostaglandina que podem ativar diferentes proteínas G, induzindo a ativação de diferentes vias de sinalização (NARUMIYA et al., 1999; BREYER et al., 2001; NARUMIYA, FITZGERALD, 2001). Entre elas a via da AC/AMPc - que classicamente induz a ativação da pKA e como recentemente demonstrado, também da pKcε (SACHS et al., 2009)- é a que tem sido mais diretamente associada ao processo de sensibilização inflamatória. Portanto, para avaliar quais mecanismos bioquímicos iniciados pela PGE_2 são responsáveis pela ativação do TRPA1, utilizamos os mediadores que atuam nos diferentes estágios da cascata de eventos intracelulares induzida pela PGE_2 (AMPc, pKA e pKcε) e verificamos o efeito do bloqueio do receptor TRPA1 na resposta hiperalgésica de cada um deles. O pico da hiperalgesia induzida individualmente por

esses mediadores ocorreu três horas após a injeção, e nesse tempo, foi semelhante àquela induzida pela PGE_2 , o que está de acordo com dados previamente publicados (FERREIRA, NAKAMURA, 1979; TAIWO, LEVINE, 1991; ALEY, LEVINE, 1999; CESARE et al., 1999; CUNHA et al., 1999; SOUZA et al., 2002; CUNHA et al., 2004; KASSUYA et al., 2007; SACHS et al., 2009). Portanto, a habilidade do antagonista e/ou do ODN-antisense contra TRPA1 em reduzir a hiperalgesia induzida por cada mediador foi avaliada três horas após sua injeção. Nossos dados demonstram que o receptor TRPA1 medeia a hiperalgesia induzida pelo AMPc, pela pKA ou pela pKC ϵ . Os dados com ODN-antisense demonstram especificamente que a diminuição da expressão do receptor TRPA1 em neurônios do gânglio da raiz dorsal diminui a hiperalgesia induzida pela pKA e pela pKC ϵ . Ao contrário do que ocorre com a PGE_2 , o ODN-antisense contra TRPA1 não preveniu, apenas reduziu significativamente, a hiperalgesia induzida pela pKA ou pKC ϵ . O efeito do antagonista de receptores TRPA1 sobre a hiperalgesia induzida pelo AMPc, pKA ou pKC ϵ também foi proporcionalmente menor que aquele observado na hiperalgesia induzida pela PGE_2 . Essa diferença pode ser facilmente explicada pelo fato de que a administração de PGE_2 , ao ativar especificamente seus receptores acoplados a proteína G, induz a formação ou ativação endógena desses mediadores (AMPc, pKA ou pKC ϵ). Ao contrário, quando cada mediador é administrado a amplitude da resposta bioquímica intracelular pode ser totalmente diferente, não só por que a quantidade administrada possivelmente difere daquela produzida endogenamente, mas também por que cada um desses mediadores (AMPc, pKA ou pKC ϵ) exerce funções muito versáteis, mediando a resposta e a ativação de vários receptores além dos EPs. Portanto, embora a administração de AMPc, pKA ou pKC ϵ seja uma ferramenta farmacológica muito importante e difundida, a resposta observada perde

em especificidade quando comparada a resposta induzida por sua formação ou ativação endógena. Isso explica por que o TRPA1 é essencial a hiperalgesia induzida pela PGE_2 (que depende da produção/ativação endógena de AMPc, pKA ou pKCε) enquanto contribui de forma menos significativa para a hiperalgesia induzida por doses farmacológicas de AMPc, pKA ou pKCε.

Como o aumento do AMPc leva a ativação da pKA, que posteriormente ativa a pKCε (SACHS et al., 2009), não é possível determinar, com base nos presentes dados experimentais, se cada um desses mediadores ativa o TRPA1 paralelamente ou se a ativação do TRPA1 é mediada exclusivamente pela pKCε. O AMPc é um segundo mensageiro extremamente versátil, entre as diversas alterações bioquímicas intracelulares por ele iniciadas podemos citar a abertura de canais de cálcio (KAUPP; SEIFERT, 2002). Como já foi demonstrado que o aumento nos níveis de Ca^{++} intracelular pode ativar o TRPA1, é possível que o aumento nos níveis de AMPc, por si só, contribua para a ativação do TRPA1, essencial para a sensibilização inflamatória induzida pela PGE_2 . No entanto, uma das mais proeminentes conseqüências do aumento nos níveis de AMPc é a ativação da pKA e já foi demonstrado que a pKA sensibiliza o TRPA1 *in vivo* e *in vitro*, em experimentos realizados em células com expressão heteróloga e com cultura de neurônios (WANG et al., 2008; SCHMIDT et al., 2009). Portanto, mesmo que o AMPc seja capaz de ativar o TRPA1 através de um mecanismo independente de pKA, provavelmente a função dessa proteína quinase contribui de forma importante para a ativação do TRPA1, essencial para a sensibilização inflamatória induzida pela PGE_2 . No entanto, recentemente foi demonstrado que a pKA ativa a pKCε e que a função da segunda predomina sobre a função da primeira em uma fase mais tardia da hiperalgesia induzida pela PGE_2 (SACHS et al., 2009). Portanto, independente da pKA ativar

diretamente o TRPA1, nossos dados demonstram que a pKC ϵ também o faz. De fato, inúmeros mecanismos bioquímicos iniciados em resposta a inflamação, além da pKA e pKC ϵ , são capazes de ativar ou sensibilizar o TRPA1, por exemplo, íons cálcio (JORDT et al., 2004; DOERNER et al., 2007, ZURBORG et al., 2007) , DAG (BANDELL et al., 2004), hidrólise do PIP₂ (DAI et al., 2007; WANG et al., 2008), p38 MAPK (OBATA et al., 2005), NO (MIYAMOTO et al. 2009; KOIVISTO, 2011). Portanto, é possível que *in vivo* esses múltiplos mecanismos contribuam de forma paralela e sinérgica para a ativação do TRPA1, nesse caso talvez o próprio AMPc e provavelmente a pKA juntamente com a pKC ϵ mediem a ativação do TRPA1 essencial para a sensibilização inflamatória induzida pela PGE₂. De fato, dois estudos recentes demonstram que a sensibilização do TRPA1 é mais eficiente na presença concomitante da pKA e da PLC (WANG et al., 2008; SCHMIDT et al., 2009), que também é capaz de ativar a pKC. Sendo assim, é lógico supor que, *in vivo* durante um processo inflamatório, a PGE₂ ative a pKA e a pKC ϵ que convergem para ativar o TRPA1 de forma sinérgica.

Até o presente momento, não há dados na literatura que expliquem o mecanismo pelo qual a pKA e a pKCe ativam o TRPA1. Já foi demonstrado, por exemplo, que o TRPV1 é sensibilizado e/ou ativado ao sofrer fosforilação por essas quinases (BHAVE et al., 2003; MORIYAMA et al., 2005; FAN, LEE, MCNAUGHTON, 2009). No entanto, até onde sabemos esse mecanismo de fosforilação não foi comprovado para o TRPA1 e ainda não foi identificado na estrutura molecular desse receptor um sítio intracelular onde essas quinases poderiam fosforilá-lo. Independente de uma possível ativação mediada pela fosforilação direta do TRPA1 pela pKA e pKCe, já foi demonstrado que pKA e PLC estimulam a translocação de

receptores TRPA1 para a membrana celular, aumentando dessa forma a quantidade de TRPA1 funcionalmente disponíveis (SCHMIDT et al., 2009).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou os seguintes achados: (1) O TRPA1 medeia a hiperalgesia inflamatória induzida pela administração de PGE_2 ; (2) A resposta basal não foi alterada pela administração do antagonista e antisense do TRPA1; (3) A administração intraplantar de PGE_2 não aumentou significativamente a expressão do TRPA1 em células do gânglio da raiz dorsal (L5 e 6) ; (4) O bloqueio farmacológico do receptor TRPA1 por seu antagonista seletivo (HC), diminui significativamente a hiperalgesia induzida pela administração de PGE_2 , AMPc, pKA e pKC ϵ ; (5) A administração de ODN-antisense para o receptor TRPA1, bloqueou a hiperalgesia induzida pela PGE_2 , diminui significativamente a hiperalgesia inflamatória induzida por pKA e pKC ϵ e diminui significativamente a expressão do receptor TRPA1 em células do gânglio da raiz dorsal (L5 e 6).

Esse trabalho demonstra que a função do receptor ionotrópico neuronal TRPA1 é essencial para a sensibilização inflamatória induzida pela PGE_2 *in vivo*. As prostaglandinas podem ser consideradas os principais mediadores da dor inflamatória, que é a mais comum entre as condições dolorosas. Portanto, os dados aqui apresentados têm significativo impacto científico e possivelmente terapêutico, uma vez que abrirão caminho para estudos futuros que avaliem o potencial terapêutico de fármacos que combatam a dor inflamatória ao bloquear o receptor TRPA1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **J Neurosci** 19: 2181–2186, 1999.

ALTIER, C.; DUBEL, S.J.; BARRERE, C.; JARVIS, S.E.; STOTZ, S.C.; SPAETGENS, R.L.; SCOTT, J.D.; CORNET, V.; DE WAARD, M.; ZAMPONI, G.W. Trafficking of L-type calcium channels mediated by the postsynaptic scaffolding protein AKAP79. **J. Biol. Chem.** 277, 33598–33603, 2002.

ANDRADE EL, LUIZ AP, FERREIRA J, CALIXTO JB. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neuroscience**;152(2):511-520, 2008.

AMADESI, S., COTTRELL, G.S., DIVINO, L., CHAPMAN, K., GRADY, E.F., BAUTISTA, F., KARANJIA, R., BARAJAS-LOPEZ, C., VANNER, S., VERGNOLLE, N., AND BUNNETT, N.W.. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase Cepsilon- and A-dependent mechanisms in rats and mice. **J. Physiol.** 575, 555–571, 2006.

AHERN, G. P.; BROOKS, I. M.; MIYARES, R. L.; WANG, X. B. Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. **J Neurosci**, v. 25, n. 21, p. 5109-16, 2005.

AMBUDKAR, I.S. Trafficking of TRP channels: determinants of channel function. **Handb. Exp. Pharmacol.** 179, 541–557, 2007.

BANDELL, M.; STORY, G.M.; HWANG, S.W.; VISWANATH, V.; EID, S.R.; PETRUS, M.J.; EARLEY, T.J.; PATAPOUTIAN, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**; 41(6):849-857, 2004.

BAUTISTA, D.M.; MOVAHED, P.; HINMAN, A.; AXELSSON, H.E.; STERNER, O.; HOGESTATT, E.D.; JULIUS, D.; JORDT, S.E.; ZYGMUNT, P.M. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102:12248–12252, 2005.

BAUTISTA, D.M.; JORDT, S.E.; NIKAI, T.; TSURUDA, P.R.; READ, A.J.; POBLETE, J.; YAMOA, H. EN.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**;124(6):1269-1282, 2006.

BAO, T.; PUCI, M.L.; CHAN, B.S.; LU, R.; ITO, S.; SCHUSTER, V.L. Prostaglandin transport PGT in expressed in cells types the synthesize and release prostanoids. **Am J Physiology Renal Physiol.**, V.282, p.1103 -1110, 2002.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, 2009.

BHATTACHARYA, M.R.C.; BAUTISTA, D.M.; WU, K.; HAEBERLE, H.; LUMPKIM, E.A.; JULIUS, D. Radial stretch reveals distinct populations of mechanosensitive mammalian somatosensory neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 105(50), 20015-20020, 2008.

BESSON, P.; PERL, E.R - Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **J Neurophysiol**,; 32:1025-1043, 1969.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-5, 1999.

BEDBROOK, G.M. Injuries of the Thoracolumbar Spine with Neurological Symptoms, em: Vinken PJ, Bruyn GW - **Handbook of Clinical Neurology** Amsterdam. 25th ed., North-Holland,;437-466, 1976.

BESSAC, B .F.; JORDT, S. E. Breathtaking TRP Channels: TRPA1 and TRPV1 in Airway Chemosensation and Reflex Control. **Physiology (Bethesda)**. December, 23: 360–370, 2008.

BHAVE, G.; HU, H. J.; GLAUNER, K. S.; ZHU, W.; WANG, H.; BRASIER, D. J.; OXFORD, G. S.; GEREAU, R. W. T. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 21, p. 12480-5, 2003.

BONNINGTON, J.F.; MCNAUGHTON, P.A. Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. **J Physiol**, 551(2), 433-446, 2003.

BOWLES W.R, SABINO M, HARDING-ROSE C, HARGREAVES K.M. Nerve growth factor treatment enhances release of immuno - reactive calcitonin gene-related peptide but not substance P from spinal dorsal horn slices in rats. **Neurosci Lett** 363:239-242, 2004.

BREYER, R.M.; BAGDASSARIAN, C.K.; MYERS, S.A.; BREYER, M.D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 41:661-690, 2001.

BRIERLEY S.M, HUGHES P.A., PAGE A J, KWAN K Y, MARTIN CM, O'DONNELL T A, COOPER N J. The Ion Channel TRPA1 Is Required for Normal Mechanosensation and Is Modulated by Algesic Stimuli. **Gastroenterology**, 137 (6), 2084-2095, 2009.

CALIXTO, J.B., KASSUYA, C.A., ANDRÉ, E., FERREIRA, J. Contribution of natural products of the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol. Ther.**, 106, 179-208. 2005.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-24, 1997.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 487-517, 2001.

CAVANAUGH, E.J.; SIMKIN, D.; KIM, D. Activation of transient receptor potential A1 channels by mustard oil, tetrahydrocannabinol and Ca(2+) reveals different functional channel states. **Neuroscience**. 2008

CESARE, P.; DEKKER, L.V.; SARDINI, A.; PARKER, P.J.; MCNAUGHTON, P.A.. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. **Neuron** 23, 617–624, 1999.

CHEN, J.; ZHANG, X.F.; KORT, M.E.; HUTH, J.R.; SUN, C.; MIESBAUER, L.J.; CASSAR, S.C.; NEELANDS, T.; SCOTT, V.E.; MORELAND, R.B.; REILLY, R.M.; HAJDUK, P.J.; KYM, P.R.; HUTCHINS, C.W.; FALTYNEK, C.R. Molecular determinants of species-specific activation or blockade of TRPA1 channels. **J Neurosci**;28:5063–5071, 2008

CHUANG, H. H.; PRESCOTT, E. D.; KONG, H.; SHIELDS, S.; JORDT, S. E.; BASBAUM, A. I.; CHAO, M. V.; JULIUS, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. **Nature**, v.411, n. 6840, p. 957-62, 2001.

COGHLAN, V.M.; PERRINO, B.A.; HOWARD, M.; LANGEBERG, L.K.; HICKS, J.B.; GALLATIN, W.M.; AND SCOTT, J.D. Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. **Science** 267, 108–111, 1995.

COHN, S. N.; SCHOLOEMANN, S.; TESSNER, T.; SEIBRIT, .; STENSON, W.S. Cryptstem cell survival in the mouse intestinal epithelium regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. **Journal of clinic investigation**, v. 99, p.1367-1379, 1997.

COLLEDGE, M.; DEAN, R.A.; SCOTT, G.K.; LANGEBERG, L.K.; HUGANIR, R.L.; SCOTT, J.D. Targeting of PKA to glutamate receptors through a MAGUK- AKAP complex. **Neuron** 27, 107–119, 2000.

COLLETT, B. J. Opioid tolerance: the clinical perspective. **Br. J. Anaesth.**, 81, 58-68. 1998.

COSENS, D. Blindness in a Drosophila mutant. **J. Insect Physiol.**, 17, 285- 302. 1971.

COUTAUX, A; ADAM, F; WILLER, J.C; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, 72 (5), 359-371, 2005

CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems-cyclic AMP and cyclic GMP – on inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, 127: 671–678, 1999.

CUNHA, J.M.; ERA, G.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Endothelins induce ETB receptor-mediated mechanical hypernociception in rat hindpaw: roles of cAMP and protein kinase C. **Eur J Pharmacol**, 501:87–94, 2004.

CRUZ-ORENGO L, DHAKA A, HEUERMAN RJ, YOUNG TJ, MONTANA MC, CAVANAUGH EJ, KIM D, STORY GM. Cutaneous nociception evoked by 15-delta PGJ2 via activation of ion channel TRPA1. **Molecular Pain**; 4:30, 2008.

DA COSTA D.S.M., MEOTTI F.C., ANDRADE E.L., LEAL P.C., MOTTA E.M., CALIXTO J.B. The involvement of the transient potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. **Pain**, v. 148, p. 431-437, 2010.

DAI Y, WANG S, TOMINAGA M, YAMAMOTO S, FUKUOKA T, HIGASHI T, KOBAYASHI K, OBATA K, YAMANAKA H, NOGUCHI K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. **J Clin Invest.**, 117(7):1979-1987, 2007.

DANET- DESNOYERS, G.; WETZELS,C.; THATCHER, W.W. Natural and recombinant interferon- γ regulate basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandins F2 α and E2 by epithelial cells and stromal cells in the endometrium. **Reproduction and Fertility Development**, v.6, p.193-202, 1994.

DAVIES, P.; BAILEY, P.J.; GOLDENBERG, M.M.; FORD-HUTCHINSON, A.W. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. **Annu Rev Immunol** 2:335–357, 1984.

Dicas resumidas sobre normalização de trabalhos acadêmicos da UFPR: Disponível em: < <http://www.portal.ufpr.br/normatização.html>>. Acesso em: 12/08/2011.

DE ROOIJ, J.; ZWARTKRUIS, F.J.; VERHEIJEN, M.H.; COOL, R.H.; NIJMAN, S.M.; WITTINGHOFER, A.; BOS, J.L.. Epac is a Rap1 guanine nucleotide exchange factor directly activated by cyclic AMP. **Nature**, 396, 474–477, 1998.

DIOGENES, A.; AKOPIAN, A.N.; HARGREAVES, K.M. NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain. **J. Dent. Res.** 86, 550–555, 2007.

DOERNER, J.F.; GISSELMANN, G.; HATT, H.; WETZEL, C.H. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. **J Biol Chem**; 282:13180–13189, 2007 .

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br J Anaesth**; 75(2):125-131, 1995.

DUNHAN, J.P.; KELLY, S.; DONALDSON, L.F. Inflammation reduces mechanical thresholds in a population of transient receptor potential channel A1-expressing nociceptor in the rat. **Eur J Neurosci**; 27:3151-60, 2008 .

DUNN P M; RANG H P. Bradykinin-induced depolarization of primary afferent nerve terminal in neonatal rat spinal cord in vitro. **British Journal Pharmacology**, 100 (3), 656-660, 1990.

EID, S.R.; CROWN, E.D.; MOORE, E.L.; LIANG, H.A.; CHOONG, K.C.; DILMA, S.; HENZE, D.A.; KANE, S.A.; URBAN, M.O. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory - and a neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. **Mol Pain**;4:48, 2008 .

ENGLAND, S.; BEVAN, S.; DOCHERTY, R.J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. **J. Physiol.** 495, 429–440, 1996.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonemal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology and medicine*, 11(1), 81-128, 1991.

FAN, H.; LEE Y.; MCNAUGHTON, P.A. Pain, and why we need it. **J Med Sci**, 29(5), 233-241, 2009.

FERNANDES E S; RUSSEL F A; SPINA D; MCDOUGALL J J; GRAEPEL R; GENTRY C; STANILAND A A; MOUNTFORD J E; KEEBLE J E; MALCANGIO M; BEVANT S; BRAIN S D. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, 63 (3), 819-829, 2011.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA M. I. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandins*; 18(2):179-190, 1979.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; DE CAMPOS, D.I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain** 42, 365–371, 1990.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British journal of pharmacology**, 110(3):1227-1231, 1993.

FERREIRA, J.; DA SILVA, G. L.; CALIXTO, J. B. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **Br J Pharmacol**, v. 141, n. 5, p. 787-94, 2004.

FIEBICH, B.L.; SCHLEICHER, S.; SPLEISS, O.; CZYGAN, M.; HULL, M. Mechanisms of prostaglandin E2-induced interleukin-6 release in astrocytes: possible involvement of EP4-like receptors, p38 mitogenactivated protein kinase and protein kinase C. **J Neurochem** 79: 950–958, 2001.

FISCHER, L.; TAMBELI, C.H.; PARADA, C.A. TRPA1-mediated nociception. **Neuroscience**;155(2):337-338, 2008.

FREDERICK J; BUCK M E; MATSON D J; CORTRIGHT D N. Increased TRPA1, TRPM8, and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 358 (4), 1058-1064, 2007.

GAO, T.; YATANI, A.; DELL'ACQUA, M.L.; SAKO, H.; GREEN, S.A. DASCAL, N.; SCOTT, J.D.; HOSEY, M.M. cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca^{2+} channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. **Neuron** 19, 185–196, 1997.

GATTI, R.; ANDRE, E.; AMADESI, S.; DINH, T.Q.; FISCHER, A.; BUNNETT, N.W.; HARRISON, S.; GEPPETTI, P.; TREVISANI, M. Protease-activated receptor-2 activation exaggerates TRPV1-mediated cough in guinea pigs. **J Appl Physiol**;101:506–511, 2006.

GEPPETTI, P.; HOLZER, P. **Neurogenic Inflammation** (CRC Press, Boca Raton), 1996.

GOLD, M.S.; LEVINE, J.D.; CORREA, A.M. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE₂-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. **J. Neurosci.** 18, 10345–10355, 1998 .

GOLD, M.S.; REICHLING, D.B.; SHUSTER, M.J.; LEVINE, J.D. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na^{+} current in nociceptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93, 1108–1112, 1996 .

GU, Q.; LEE, L.Y. Hypersensitivity of pulmonary chemosensitive neurons induced by activation of protease-activated receptor-2 in rats. **J Physiol**;574:867–876, 2006.

GUO, A.; VULCHANOVA, L.; WANG, J.; LI, X.; ELDE, R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X₃ purinoceptor and IB₄ binding sites. **Eur J Neurosci** 11, 946–958, 1999.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo:Manole, 2004. 513p.

HENRY, D.; LIM, L. L.Y.; GARCIA-RODRIGUES, L. A. Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. **BMJ**, 312, 1563-1566. 1996

HINMAN A, CHUANG HH, BAUTISTA DM, JULIUS D. TRP channel activation by reversible covalent modification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**;103(51):19564-19568, 2006.

HATA, A.N.; BREYER, R.M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacol Ther** 103: 147–166, 2004 .

HATAE, N.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A. Prostaglandin receptors: advances in the study of EP₃ receptor signaling. **J Biochem** 131: 781–784, 2002.

HOSHI, N.; LANGEBERG, L.K.; SCOTT, J.D. Distinct enzyme combinations in AKAP signalling complexes permit functional diversity. **Nat. Cell Biol.** 7, 1066–1073, 2005.

HU, H. J.; BHAVE, G.; GEREAU, R. W. T. Prostaglandin and protein kinase A dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. **J Neurosci**, v. 22, n.17, p. 7444-52, 2002.

HUCHO, L.; LEVINE, J.D. Signaling Pathways in Sensitization: Toward a Nociceptor Cell Biology. **Neuron**, 55, 2007.

HWANG, S. W.; CHO, H.; KWAK, J.; LEE, S. Y.; KANG, C. J.; JUNG, J.; CHO, S.; MIN, K. H.; SUH, Y. G.; KIM, D.; OH, U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 11, p. 6155-60, 2000.

IASP (International Association for the Study of Pain). *IASP Pain Terminology*. 2^a ed. Seattle, 1994. Disponível em: <[http:// www.iasp-pain.org/terms-p.html](http://www.iasp-pain.org/terms-p.html) >. Acess in march 2009.

INOUE, T.; BRYANT, B.P. Multiple types of sensory neurons respond to irritating volatile organic compounds (VOCs): Calcium fluorimetry of trigeminal ganglion neurons. **Pain.**, 2005.

JANCSO, N.; JANCSO-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. **Br J Pharmacol**;31:138–151, 1967 .

JI, R.; WOOLF, C.J. Neuronal Plasticity and Signal Transduction in Nociceptive Neurons: Implications for the Initiation and Maintenance of Pathological Pain. **Neurobiology of Disease**, 8, 1-10, 2001.

JORDT, S.E.; BAUTISTA, D.M.; CHUANG, H.H.; MCKEMY, D.D.; ZYGMUNT, P.M.; HOGESTATT, E.D.; MENG, I.D.; JULIUS, D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. **Nature**; 427:260–265, 2004.

JULIUS, D., BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 413, 203-210. 2001.

KALIL-GASPAR, P. Neuropeptídeos na pele. **An. Bras. Dermatol.**, 78, 483- 498. 2003.

KOLLARIK, M.; UNDEM, B.J. Activation of bronchopulmonary vagal afferent nerves with bradykinin, acid and vanilloid receptor agonists in wild-type and TRPV1-/- mice. **J Physiol** 555:115–123, 2004.

KASSUYA, C.A.; FERREIRA, J.; CLAUDINO, R.F.; CALIXTO, J.B. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. **Br J Pharmacol** 150: 727–737, 2007.

KAUPP, U.B.; SEIFERT, R.. Cyclic nucleotide-gated ion channels. **Physiol. Rev.** 82, 769–824, 2002.

KARASHIMA, Y.; PRENEN, J.; MESEGUER, V.; OWSIANIK, G.; VOETS, T.; NILIUS, B. Modulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate manipulators. **Pflügers Arch.** 2008.

KATSURA, H.; OBATA, K.; MIZUSHIMA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; TOKUNAGA, A.; SAKAGAMI, M.; NOGUCHI, K. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. **Exp Neurol**; 200(1):112-123, 2006.

KERSTEIN P C; DEL CAMINO D; MORAN M M; STUCKY C L; Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors. **Molecular Pain.** 5, art 9, 2009.

KIM, D.; CAVANAUGH, E.J. Requirement of a soluble intracellular factor for activation of transient receptor potential A1 by pungent chemicals: role of inorganic polyphosphates. **J Neurosci**;27:6500–6509, 2007 .

KHASAR, S.G., LIN, Y.H., MARTIN, A., DADGAR, J., MCMAHON, T., WANG, D., HUNDLE, B., ALEY, K.O., ISENBERG, W., MCCARTER, G. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. **Neuron** 24, 253–260, 1999.

KIM, D.; CAVANAUGH, E.; SIMKIN, D. Inhibition of Transient Receptor Potential A1 by Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2008

KLAUCK, T.M.; FAUX, M.C.; LABUDDA, K.; LANGEBERG, L.K.; JAKEN, S., SCOTT, J.D. Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science* 271, 1589–1592, 1996.

KOBAYASHI, K.; FUKUOKA, T.; OBATA, K.; YAMANAKA, H.; DAI, Y.; TOKUNAGA, A. Distinct expression of TRPM8, TRPA1 and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with A δ - and C-fibers and colocalization with trk receptors. **J Comp Neurol**;493: 596-606, 2005.

KOIVISTO A. Sustained TRPA1 activation in vivo. Article in press, 2011.

KWAN, K.Y.; ALLCHORNE, A.J.; VOLLRATH, M.A.; CHRISTENSEN, A.P.; ZHANG, D.S.; WOOLF, C.J.; COREY, D.P. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. **Neuron**; 50:277–289, 2006.

KWAN, K.Y.; GLASER, J.M.; COREY D.P.; RICE, F.L.; STUKY, C.L. TRPA1 Modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. **J Neurosci**, v. 29, n. 15, p. 4808-4819, 2009.

KRESS, M.; RODL, J.; REEH, P.W..Stable analogues of cyclic AMP but not cyclicGMPsensitize unmyelinated primary afferents in rat skin to heat stimulation but not to inflammatory mediators, in vitro. **Neuroscience** 74, 609–617, 1996.

LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: targets for the relief of pain. **Biochim Biophys Acta**, v. 1772, n. 8, p. 989-1003, 2007.

LEWIN, G.R.; MENDELL, L.M. Nerve growth factor and nociception. **Trends Neurosci** 16:353-359, 1993.

LEWIN, G.R.; MOSHOURAB, R. Mechanosensation and pain. **J. Neurobiol.** 61, 30–44, 2004.

LIU, L.; ZHU, W.; ZHANG, Z. S.; YANG, T.; GRANT, A.; OXFORD, G.; SIMON, S.A. Nicotine inhibits voltage-dependent sodium channels and sensitizes vanilloid receptors. **J Neurophysiol**, v. 91, n. 4, p. 1482-91, 2004.

MACPHERSON LJ, GEIERSTANGER BH, VISWANATH V, BANDELL M, EID SR, HWANG S, PATAPOUTIAN A. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. **Curr Biol**;15(10):929-934, 2005.

MACPHERSON, L. J.; HWANG, S. W.; MIYAMOTO, T.; DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A.; STORY, G. M. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. **Mol Cell Neurosci**, v. 32, n. 4, p. 335-43, 2006.

MACPHERSON LJ, DUBIN AE, EVANS MJ, MARR F, SCHULTZ PG, CRAVATT BF, PATAPOUTIAN A. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. **Nature**; 445(7127):541-545, 2007a.

MACPHERSON LJ, XIAO B, KWAN KY, PETRUS MJ, DUBIN AE, HWANG S, CRAVATT B, COREY DP, PATAPOUTIAN A. An ion channel essential for sensing chemical damage. **J Neurosci**; 27(42):11412-11415, 2007b.

MALENKA, R.C. Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. **Ann. N Y Acad. Sci.** 1003, 1–11, 2003.

MARQUES, V. B. **Atividade antiluteolítica no ambiente uterino durante o período crítico para o estabelecimento da gestação em bovinos**. 146p, Tese (doutorado).Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

MATERAZZI, S.; NASSINI, R.; ANDRE, E.; CAMPI, B.; AMADESI, S.; TREVISANI, M.; BUNNETT, N.W.; PATAACCHINI, R.; GEPPETTI, P. Cox-dependent fatty acid metabolites cause pain through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proc Natl Acad Sci U S A**;105:12045–12050, 2008 .

MCNAMARA, C.R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K.L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N.J.; CHONG, J.A.; JULIUS, D.; MORAN, M.M.; FANGER, C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**;104(33):13525-13530, 2007.

MERCADANTE, S. Problems of long-term spinal opioid treatment in advanced cancer patients. **Pain**, 79, 1-13. 1999.

MEYER, R.A.; DAVIS, K.D.; COHEN, R.H.; TREEDE, R.D.; CAMPBELL, J.N. Mechanically insensitive afferents (MIAs) in cutaneous nerves of monkey. **Brain Res** 1991;561:252–261.

MINKE B. TRP channels and Ca²⁺ signaling. **Cell** 40(3), 361-275, 2006.

MIYAMOTO, T.; DUBIN, A.E.; PETRUS, M.; PATAPOUTIAN, A. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. **PLoS ONE** 4, e7596, 2009.

MORIYAMA, T.; HIGASHI, T.; TOGASHI, K.; IIDA, T.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; TOMINAGA, T.; NARUMIYA, S.; TOMINAGA, M. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. **Mol. Pain.**, 1, 3, 2005.

NAGATA, K.; DUGGAN, A.; KUMAR, G.; GARCIA-ANOVEROS, J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. **J Neurosci**;25:4052–4061, 2005 .

NAVEDO, M.F.; NIEVES-CINTRON, M.; AMBERG, G.C.; YUAN, C.; VOTAW, V.S.; LEDERER, W.J.; MCKNIGHT, G.S.; SANTANA, L.F. AKAP150 is required for stuttering persistent Ca²⁺ sparklets and angiotensin II-induced hypertension. **Circ. Res.** 102, e1–e11, 2008.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiol Rev**, 79:1193-1226, 1999.

NARUMIYA, S.; FITZGERALD, G.A. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. **J Clin Invest** 108:25-30, 2001.

NEGUS, S. S., BANDERA, T. W., BRANDT, M. R., BILSKY, E. J., BECERRA, L., BORSOOK, D. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: Recent advances and future challenges. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 19, 507-514. 2006.

NILIUS, B. VOETS, T. TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. **Pflugers Arch.**, 451, 1-10. 2005.

OBATA K, KATSURA H, MIZUSHIMA T, YAMANAKA H, KOBAYASHI K, DAI Y, FUKUOKA T, TOKUNAGA A, TOMINAGA M, NOGUCHI K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **J Clin Invest.**;115(9):2393-2401, 2005.

OKUDA, K.;MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D. J. Regulation of endometrial prostaglandin F (2 alpha) synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, n.1-2, p.255-264, 2002.

OLAH, Z., KARAI, L., AND IADAROLA, M.J.. Protein kinase C(alpha) is required for vanilloid receptor 1 activation. Evidence for multiple signaling pathways. **J. Biol. Chem.** 277, 35752–35759, 2002 .

OLIVEIRA, M.C.; PELEGRINI DA SILVA, A.; PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H. 5-HT acts on nociceptive primary afferents through an indirect mechanism to induce hyperalgesia in the subcutaneous tissue. **Neuroscience**, 145(2), 708-14, 2007.

PAPIR-KRICHELI, D.; FREY, J.; LAUFER, R.; GILON, C.; CHOREV, M.; SELINGER, Z.; DEVOR, M. Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists. **Pain**;31(2):263-276, 1987.

PARADA, C.A., YEH, J.J., REICHLING, D.B., LEVINE, J.D.. Transient attenuation of protein kinase Cepsilon can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. **Neuroscience** 120, 219–226, 2003.

PARADA, C.A.; REICHLING, D.B.; LEVINE, J.D. Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCepsilon second messenger pathways. **Pain**;113(1-2):185-190, 2005.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 1, p. 55-68,2009.

PETRUS M, PEIER AM, BANDELL M, HWANG SW, HUYNH T, OLNEY N, JEGLA T, PATAPOUTIAN A. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. **Molecular Pain**; 3:40, 2007

PIOTROWSKI, W.; FOREMAN, J.C . Some effects of calcitonin generelated peptide in human skin and on histamine release. **Br J Dermatol**;;114:37-46, 1986.

PREMKUMAR, L.S.; AHERN, G.P.. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. **Nature** 408, 985–990, 2000.

PRICE TJ, LOURIA MD, CANDELARIO-SOTO D, DUSSOR GO, JESKE NA, PATWARDHAN AM.. Treatment of trigeminal ganglion neurons in vitro with NGF, GDNF or BDNF: effects on neuronal survival, neurochemical properties and TRPV1-mediated neuropeptide secretion. **BMC Neurosci** 6:4, 2005 .

PROBER DA; ZIMMERMAN S; MYERS B R; MC DERMOTT Jr, BM; KIM SH; CARON S; RIHEL J; SCHIER AF, Zebrafish TRPA1 channels are required for chemosensation but not thermosensation or mechanosensory hair cell function. **Journal of Neuroscience** 28 (40), 10102-10110, 2008.

RATHEE, P.K.; DISTLER, C.; OBREJA, O.; NEUHUBER, W.; WANG, G.K.; WANG, S.Y. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. **J Neurosci**; 22: 4740–5, 2002.

RAMSEY, I.S.; DELLING, M.; CLAPHAM, D.E. An introduction to TRP channels. **Annu Rev Physiol**;;68:619–647, 2006.

RO, J.Y.; LEE, J.S.; ZHANG, Y. Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia. **Pain**., 144, 270-277, 2009.

RUGIERO F; WOOD J N, The machanosensitive cell line ND-C does not express functional thermoTRP channels. **Neuropharmacology** 42 (3), 219-225, 2009.

SANDOZ, G.; THUMMLER, S.; DUPRAT, F.; FELICIANGELI, S.; VINH, J.; ESCOUBAS, P.; GUY, N.; LAZDUNSKI, M.; LESAGE, F. AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K(+) channels into open leak channels. **EMBO J.** 25, 5864–5872, 2006 .

SACHS, D.; VILLARREAL, C.; CUNHA, F.; PARADA, C.; FERREIRA, S. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. **British journal of pharmacology**; 156(5):826-834, 2009.

SAMAD, T.A., SAPIRSTEIN, A, WOOLF C.J. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. **Trends Mol Med**;8(8):390-396, 2002.

SEBERT, M.E.; SHOOTER, E.M. Expression of mRNA for neurotrophic factors and their receptors in the rat dorsal root ganglion and sciatic nerve following nerve injury. **J Neurosci Res** 36:357-367, 1993.

SCHER, J.U.; PILLINGER, M.H. 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? **Clin Immunol**, 114(2):100-9, 2005.

SCHMIDT, M.; DUBIN, A. E.; PETRUS, M.J.; EARLEY, T.J.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptive Signals Induce Trafficking of TRPA1 to the Plasma Membrane. **Neuron**, 64(4). 498-509, 2009.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nat. Neurosci.** 5 (Suppl.), 1062–1067, 2002.

SCHUSTER, V.L. Molecular mechanism of prostaglandin transport. **Annu Rev Physiol.**, v.60, p.221-242, 1998.

SCHUSTER, V.L. Prostaglandin transport. **Prostagl Other Lipid Mediat.**, v.68-69, p.633- 647, 2002.

SHIBATA, T. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. **J Biol Chem**, 277(12):10459-66, 2002.

SHEPHERD, J.D.; HUGANIR, R.L.. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 23, 613–643, 2007.

SHIM, W.S.; TAK, M.H.; LEE, M.H.; KIM, M.; KOO, J.Y.; LEE, C.H.; OH, U. TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12 lipoxygenase. **J Neurosci** 2007;27:2331–2337.

SOUZA, A. L.; MOREIRA, F. A.; ALMEIDA, K. R.; BERTOLLO, C. M.; COSTA, K. A.; COELHO, M. M. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. **Br J Pharmacol**, v. 135, n. 1, p. 239-47, 2002.

SIEMENS, J.; ZHOU, S.; PISKOROWSKI, R.; NIKAI, T.; LUMPKIN, E. A.; BASBAUM, A. I.; KING, D.; JULIUS, D. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. **Nature**, v. 444, n. 7116, p. 208-12, 2006.

SKOFF A.M.; ADLER J.E. Nerve growth factor regulates substance P in adult sensory neurons through both TrkA and p75 receptors. **Exp Neurol** 197:430-436, 2006.

SMITH, F.D.; LANGEBOG, L.K.; SCOTT, J.D. The where's and when's of kinase anchoring. *Trends Biochem. Sci.* 31, 316–323, 2006.

SHU, X.Q.; LLINAS, A.; MENDELL, L.M. Effects of trkB and trkC neurotrophin receptor agonists on thermal nociception: a behavioral and electrophysiological study. **Pain** 80, 463–470, 1999.

SMITH, M.P.; BEACHAM, D.; ENSOR, E.; KOLTZENBURG, M. Cold-sensitive, mentholinsensitive neurons in the murine sympathetic nervous system. **Neuroreport**, 15: 1399-1403, 2004.

STORY, G.M.; PEIER, A.M.; REEVE A.J.; EID, S.R.; MOSBACHER, J.; HRICIK, T.R.; EARLEY, T.J.; HERGARDEN, A.C.; ANDERSSON, D.A.; HWANG, S.W.; MCINTYRE, P.; JEGLA, T.; BEVAN, S.; PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, 112(6):819-829, 2003 .

STRAUS, D.S.; GLASS, C.K. Cyclopentenone prostaglandins: New insights on biological activities and cellular targets. **Med Res Rev** 21:185–210, 2001.

SULLINS JS, CARNES DL JR, KALDESTAD RN, WHEELER EF. Time course of the increase in trk A expression in trigeminal neurons after tooth injury. **J Endod** 26:88-91, 2000.

TAIWO, Y.O.; BJERKNES, L.K.; GOETZL, E.J.; LEVINE, J.D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience** 32, 577–580, 1989 .

TAIWO, Y.O.; LEVINE J.D. Further confirmation of the role of adenyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience**; 44(1):131-135, 1991.

TAYLOR-CLARK TE, UNDEM BJ, MACGLASHAN DW, JR., GHATTA S, CARR MJ, MCALEXANDER MA. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). **Mol Pharmacol**; 73(2):274-281, 2008.

TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: DICKENSON, A.; BESSON, J. M. (Ed.). **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer-Verlag, 1997.p. 1-20.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M.J.; MALMBERG, A.B.; ROSEN, T.A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B.E.; BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**; 21:531–543, 1998.

TRACEY, W.D Jr.; WILSON R.I.; LAURENT G.; BENZER S. Painless, a *Drosophila* gene essential for nociception. **Cell**, v. 113, p. 261-273, 2003.

TREVISANI, M.; SMART, D.; GUNTORPE, M. J.; TOGNETTO, M.; BARBIERI, M.; CAMPI, B.; AMADESI, S.; GRAY, J.; JERMAN, J. C.; BROUGH, S. J.; OWEN, D.; SMITH, G. D.; RANDALL, A. D.; HARRISON, S.; BIANCHI, A.; DAVIS, J. B.; GEPPETTI, P. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. **Nat Neurosci**, v. 5, n. 6, p. 546-51, 2002.

TREVISANI M, SIEMENS J, MATERAZZI S, BAUTISTA DM, NASSINI R, CAMPI B, IMAMACHI N, ANDRE E, PATACCHINI R, COTTRELL GS, GATTI R, BASBAUM AI, BUNNETT NW, JULIUS D, GEPPETTI P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**;104(33):13519-13524, 2007.

TYMPANIDIS, P.; CASULA, M. A.; YIANGOU, Y.; TEREINGHI, G.; DOWD, P.; ANAND, P. Increased vanilloid receptor VR1 innervation in vulvodynia. **Eur J Pain** 8, 129– 133, 2004.

UCHIDA K; STADTMAN E R, Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross- linking reaction. *Journal of Biological Chemistry* 268 (9), 6388-6393, 1993.

VELAZQUEZ, K. T.; MOHAMMAD, H.; SWEITZER, S. M. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. **Pharmacol Res**, v. 55, n. 6, p. 578-89, 2007.

VILCEANU D; STUCKY C L. TRPA1 Mediates Mechanical currents in the plasma membrane of Mouse Sensory Neurons. **PLoS ONE** 5 (8), Article number e12177, 2010.

WALKER, R. G.; WILLINGHAM, A.T.; ZUCKER, C.S. A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. **Science**, v. 287, p. 2229-2234, 2000.

WANG S, DAI Y, FUKUOKA T, YAMANAKA H, KOBAYASHI K, OBATA K, CUI X, TOMINAGA M, NOGUCHI K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain**, 2008.

WINTER, J.; ALISTAIR FORBES, C.; STERNBERG, J.; LINDSAY R.M. Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to the excitotoxin capsaicin. **Neuron**, 1(10), 973-981, 1988.

WOOLF, C.J.; COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96:7723 7730, 1999.

WOOLF, C.J., SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, 288, 1765-1769. 2000.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron**, v. 55, n.3, p. 353-64, 2007.

WOODCOCK, J., WITTER, J., DIONNE, R. A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. **Nat. Rev.**, 6, 703-710. 2007.

WHEELER, E.F.; NAFTEL, J.P.; PAN, M.; VON BARTHELD, C.S.; BYERS, M.R. Neurotrophin receptor expression is induced in a subpopulation of trigeminal neurons that label by retrograde transport of NGF or fluoro-gold following tooth injury. **Brain Res Mol Brain Res** 61:23-38, 1998.

WHITTLE, B.J.T. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Fund. Clin. Pharmacol.**, 17, 301-313. 2003.

XU, H.; BLAIR, N. T.; CLAPHAM, D. E. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. **J Neurosci**, v. 25, n. 39, p. 8924-37, 2005.

YOSHIDA, T.; INOUE, R.; MORII, T.; TAKAHASHI, N.; YAMAMOTO, S.; HARA, Y.; TOMINAGA, M.; SHIMIZU, S.; SATO, Y.; MORI, Y. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. **Nat Chem Biol**, v. 2, n. 11, p. 596-607, 2006.

ZHANG, X.; LI L.; MCNAUGHTON, P.A. Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. **Neuron**; 59:450-461, 2008.

ZEILHOFER, H. U. Synaptic modulation in pain pathways. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 154, p. 73-100, 2005.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 429, n.1-3, p. 23-37, 2001.

ZURBORG S, YURGIONAS B, JIRA JA, CASPANI O, HEPPENSTALL PA. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. **Nat Neuroscience**;10(3):277-279, 2007.

ZYGMUNT, P. M.; PETERSSON, J.; ANDERSSON, D. A.; CHUANG, H.; SORGARD, M.; DI MARZO, V.; JULIUS, D.; HOGESTATT, E. D. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 452-7, 1999.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPR.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 366

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.060547/2009-32

APROVADO:

07/04/2009 – R.O. 03/2009

TÍTULO: Participação do receptor TRPA1 na hiperalgesia inflamatória induzida pela administração de carragenina na pata de ratos

AUTORES:

Luana Fischer, Aleksander R. Zampronio, Claudia Herrera Tambeli, Marcelo Dall'Acqua

DEPARTAMENTO:

Fisiologia

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi
Coordenadora do CEEA